

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. September 2003 (25.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/078468 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 16/00**,  
A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00890

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. März 2003 (13.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 12 108.7 13. März 2002 (13.03.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **TEGENERO AG** [DE/DE]; Science Park Würzburg,  
Friedrich-Bergius-Ring 15, 97078 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HUENIG, Thomas**  
[DE/DE]; Mittlere Heerbergst. 26, 97076 Wuerzburg  
(DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lüke  
& Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

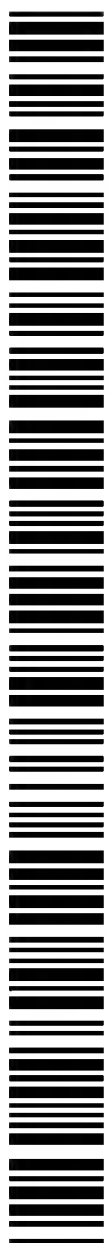
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF AN ACTIVE SUBSTANCE THAT BINDS TO CD28 FOR PRODUCING A PHARMACEUTICAL COMPO-  
SITION

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER AN CD28 BINDENDEN WIRKSUBSTANZ ZUR HERSTELLUNG EINER PHAR-  
MAZEUTISCHEN ZUSAMMENSETZUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of a superagonistic CD28-specific monoclonal antibody (mAb) or a mimic compound  
of the same, for producing a pharmaceutical composition for the induction and/or reproduction of regulatory T-cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen  
Antikörpers (mAb) oder einer Mimikriverbindung hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Induktion  
und/oder Vermehrung regulatorischer T-Zellen.



**WO 03/078468 A2**

Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

## 5 Gebiet der Erfindung.

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

10

## Definitionen.

Als monoklonale Antikörper (mAb) sind Antikörper  
15 bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die typischerweise durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind.

20

Die Aminosäuresequenz von Human CD28 ist unter der Accession No. NM\_006139 bekannt.

Das C'-D Loop von CD28 umfaßt die Aminosäuren 52 bis  
25 66 der vorstehenden CD28 Sequenz (zur Numerierung siehe auch Ostrov, D.A., et al.; Science (2000), 290:816-819). Unter dem Begriff des C'-D Loops sollen im Folgenden auch beliebige Teilsequenzen hieraus verstanden sein.

30

Ein Loop bzw. eine darin angeordnete Bindungsstelle ist frei zugänglich, wenn für einen definierten Bindungspartner für die Bindungsstelle im Loop keine

sterische Hinderung durch an das Loop anschließende Sequenzen oder Moleküle vorliegt.

Regulatorische T-Zellen sind CD4+ T-Zellen, welche in  
5 Mischung mit naiven CD4+ T-Zellen deren Aktivierung inhibieren. Hierzu gehören insbesondere CD4+CD25+ T-Zellen. Ein weiteres Merkmal regulatorischer T-Zellen ist eine vergleichsweise zu anderen T-Zellen niedrige Expression der hochmolekularen Isoformen von CD45 (human: RA). Für  
10 regulatorische T-Zellen ist die konstitutive Expression von CD152 typisch. CD4+CD8-SP Thymocyten sind eine der wesentlichen Quellen für regulatorische T-Zellen. Für eine weitergehende Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen wird auf die Literaturstelle K.J. Maloy et  
15 al., Nature Immunology, Vol. 2, No. 9, Seiten 816 ff., 2001, verwiesen.

Mit Induktion regulatorischer T-Zellen ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens,  
20 Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die Zellteilung (Proliferation) auf einen äußeren Reiz hin bezeichnet. Im Ergebnis liegen nach der Induktion mehr regulatorische T-Zellen vor als vorher.

25 Homologie bezeichnet eine zumindest 70%ige, vorzugsweise zumindest 80%ige, höchstvorzugsweise zumindest 90%ige Sequenzidentität auf Proteinebene, wobei ein homologes Protein oder Peptid einen definierten Bindungspartner mit zumindest gleicher Affinität bindet.  
30 det. Abweichungen in der Sequenz können Deletionen, Substitutionen, Insertionen und Elongationen sein.

Eine Mimikriverbindung ist eine natürliche oder synthetische chemische Struktur, die sich in einem definierten Bindungsassay wie ein definierter mAb verhält, welchen die Mimikriverbindung mimikriert.

5

Der Begriff der mAb umfaßt neben Strukturen des üblichen Fab/Fc Aufbaus auch Strukturen, die ausschließlich aus dem Fab-Fragment bestehen. Es ist auch möglich, lediglich die variable Region zu nutzen, wobei das Fragment der schweren Ketten mit dem Fragment der leichten Kette auf geeignete Weise, beispielsweise auch mittels synthetischer Brückenmoleküle, so verbunden ist, daß die Bindungsregionen der Ketten das Antikörperepitop bilden. Der Begriff der Antikörper umfaßt auch (ggf. vollständige) chimäre sowie humanisierte Antikörper.

Superagonistische Stimulation der Proliferation von CD 28 spezifischen T-Zellen meint, daß keine Costimulation, i.e. kein weiteres Bindungsereignis neben einer Bindung eines mAb oder einer Mimikriverbindung an CD28 zur Stimulation oder Inhibierung der Proliferation erforderlich ist.

25 Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung

von Antigenen, z.B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist;  
sowie 2. des auf allen ruhenden T-Zellen mit Ausnahme  
einer Untergruppe der CD8 T-Zellen des Menschen  
gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches  
5 natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer  
Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der  
Costimulation der antigenspezifischen Immunreaktion durch  
CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt  
werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des  
10 CD28-Moleküls mit geeigneten mAbs. Im klassischen System  
der Costimulation führt weder die Besetzung des  
Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur  
T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist  
jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des  
15 Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Dagegen sind auch CD28-spezifische mAbs bekannt, die ohne  
Costimulation die T-Zellproliferation einleiten können.  
Eine solche superagonistische, d. h. von der Besetzung des  
20 Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender  
T-Lymphozyten durch CD28-spezifische mAb ist aus der  
Literaturstelle Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997,  
27:239-247 bekannt. Demnach wurden zwei Arten von  
CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit  
25 unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben:  
costimulatorische mAb, die die Aktivierung ruhender  
T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des  
Antigenrezeptors costimulieren; und superagonistische mAb,  
die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten  
30 aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur  
Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte  
mAb rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen  
Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre

... jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete  
unterschiedliche Selektionen erhältlich.

Aus der Literaturstelle DE-197 22 888 ist es bekannt, daß  
5 superagonistische mAb in der Lage sind, eine Immunde-  
viation TH1 zu TH2 zu bewirken und sich insofern zum  
Einsatz gegen die Adjuvans Arthritis eignen. TH1 und TH2  
Zellen sind CD4 exprimierende T-Zellen. TH1 Zellen werden  
auch pro-inflammatorische T-Helfer-Zellen genannt und  
10 sezernieren die Cytokine IL-2, TNF und IFN- $\gamma$ . TH2 Zellen  
unterstützen die Aktivierung von B-Zellen und sezernieren  
die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10. Dabei wird die  
Differenzierung von CD4 T-Zellen zu den vorstehenden  
funktional unterschiedlichen Untergruppen nicht nur durch  
15 die verfügbaren Cytokine kontrolliert, sondern sie wird  
auch durch Costimulation über CD28 moduliert.

CD28-defiziente Mäuse zeigen normale TH1 aber reduzierte  
TH2 abhängige Antworten und das Cytokinprofil von  
TCR-transgenen CD4 Zellen wird durch CD28 Ligation in  
20 Richtung TH2 verschoben. Dagegen verhindert ein starkes  
TCR Signal CD28 vermittelte TH2 Differenzierung.

Aus der in der Literaturstelle K.J. Maloy et al., Nature  
Immunology, Vo. 2, No. 9, Seiten 816 ff., 2001,  
25 zusammengefaßten Primärliteratur ist bekannt, daß  
regulatorische T-Zellen bei Autoimmunreaktionen wichtig  
sind. So wurde z.B. in experimentellen Tiermodellen der  
Multiplen Sklerose, des Typ I Diabetes und von  
entzündlichen Darmerkrankungen die Fähigkeit dieser Zellen  
30 gezeigt, die entsprechenden Krankheitsbilder zu  
unterdrücken.



Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine akute autoimmun-inflammatorische Erkrankung des peripheren menschlichen Nervensystems. Die Inzidenz von GBS liegt bei 1-2 pro 100.000 Menschen. Die chronische Verlaufsform ist  
5 die chronische demyelinisierende Polyneuropathie (CDP). Die Inzidenz von CDP liegt bei 10-20 pro 100.000 Menschen. mAb oder verwandte Substanzen zur Prävention und/oder Behandlung dieser Krankheiten sind nicht bekannt.

10

Technisches Problem der Erfindung.

Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, mittels welcher  
15 sich regulatorische T-Zellen stimulieren lassen und welche sich insbesondere zur Prävention und/oder Behandlung der multiplen Sklerose, Typ I Diabetes, entzündlichen Darmerkrankungen, GBS und/oder CDP eignet.

20

Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung die Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen  
25 monoklonalen Antikörpers (mAb) oder einer Mimikriverbindung hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Induktion und/oder Vermehrung regulatorischer T-Zellen.

30

Die Erfindung beruht zunächst auf der Erkenntnis, daß mittels superagonistischer CD28 spezifischer Wirksubstanzen, mAb oder Mimikriverbindungen hierzu, CD4+CD25+ T-Zellen sich induzieren lassen, i.e. deren Zahl

nach Behandlung eines Organismus mit der Wirksubstanz deutlich höher ist als in einem Organismus, welcher nicht oder mit nicht-superagonistischen Wirksubstanzen behandelt wurde.

5

Weiterhin beruht die Erfindung auf der Erkenntnis, daß die erfindungsgemäß eingesetzten Wirksubstanzen offenbar ein sehr gutes Mittel zur Behandlung des Guillian-Barré-Syndroms und/oder der chronisch demyelinisierenden

10 Polyneuropathie sowie weiteren autoimmun-verbundenen Krankheiten ist. Daher lehrt die Erfindung weiterhin die erfindungsgemäße Verwendung zur Behandlung dieser Krankheiten.

15 Erfindungsgemäß verwendete superagonistische CD28 spezifische Wirksubstanzen, i.e. mAb oder Mimikriverbindungen hierzu, sind solche, die unabhängig von der Besetzung des Antigenrezeptors mehrere bis alle Untergruppen der T-Lymphozyten aktivieren.

20

Die Wirksubstanz bindet an CD28 oder an eine Teilsequenz hieraus. Die Teilsequenz kann beispielsweise eine Aminosäuresequenz Seq.-ID 1, oder 2 - 7, oder 17 enthalten, welche zumindest teilweise im Bereich des C'-D

25 Loops von CD28 liegen. An eine der Sequenzen mit Val am 5'-Ende kann eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz 8 in der dort definierten Reihenfolge angeschlossen sein. Das Loop liegt im Bereich mit der Sequenz GNYSQQQLQVYSKTGF. Erfindungsgemäße Mimikriverbindungen lassen sich in einem  
30 Screeningverfahren identifizieren, wobei eine prospektive Mimikriverbindung oder eine Mischung von prospektiven Mimikriverbindungen einem Bindungsassay mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbesondere dem C'-D-Loop,



unterworfen werden, und wobei an CD28 oder an die Teilsequenz hieraus bindende Wirksubstanzen selektiert werden, ggf. gefolgt von einem Assay zur Prüfung auf superagonistische Stimulation von mehreren bis allen 5 Untergruppen der T-Lymphozyten. Im Falle einer Mischung wird es zweckmäßig sein, eine Dekonvolution durchzuführen. Unter den selektierten Mimikriverbindungen kann gleichsam ein Ranking nach Maßgabe der Selektivität und/oder Affinität erfolgen, wobei hochaffine Wirksubstanzen 10 bevorzugt sind. Zusätzlich oder anstelle eines solchen Rankings kann ein Ranking anhand einer Quantifizierung der Induktion der Regulator T-Zellen erfolgen bzw. anhand der Hemmung der Erkrankung beispielsweise im Tierversuch anhand von Krankheitsmodellen.

15

Ein Beispiel einer erfindungsgemäß verwendeten Wirksubstanz ist ein superagonistischer CD28 spezifischer mAb. Er ist beispielsweise herstellbar, indem ein nichtmenschliches Säugetier mit CD28 oder einem Peptid mit 20 einer Teilsequenz hieraus, beispielsweise wie vorstehend angegeben oder Homologen hierzu, immunisiert wird, wobei aus dem nichtmenschlichen Säugetier Zellen entnommen und aus den Zellen Hybridomzellen hergestellt werden, und wobei die so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe 25 selektiert werden, daß in deren Kulturüberstand mAb enthalten sind, die an CD28 binden. Mit üblichen Verfahren kann eine Humanisierung durchgeführt werden. Geeignete mAb lassen sich alternativ dadurch herstellen, daß B-Lymphozyten selektiert werden, welche an das Loop 30 binden, und deren exprimierte Immunglobulingene kloniert werden. Auch ist eine Isolierung geeigneter mAb aus Phagenbibliotheken möglich.

Im Einzelnen kann es sich um einen mAb handeln, welcher mit Hybridomzellen, wie hinterlegt unter den DSM Nummern DSM ACC2531 (mAb: 9D7 bzw. 9D7G3H11) oder DSM ACC2530 (mAb: 5.11A bzw. 5.11A1C2H3), erhältlich ist. Der mAb kann eine oder mehrere der Sequenzen Seq.-ID 9, 11, 13 und/oder 15, oder eine oder mehrere Sequenzen Seq.-ID 10, 12, 14, 16, 18 und/oder 19 oder hierzu homologe Sequenzen enthalten bzw. dadurch (teilweise) codiert sein. In SEQ-ID 13 ist die Nukleinsäuresequenz der variablen Region der schweren Kette eines erfindungsgemäßen mAb 5.11A wiedergegeben. SEQ-ID 14 zeigt das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 15 zeigt die Nukleinsäuresequenz der variable Region der leichten Kette dieses mAb. SEQ-ID 16 ist das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 9 zeigt die Nukleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette eines erfindungsgemäßen mAb 9D7 wiedergegeben. SEQ-ID 10 zeigt das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 11 zeigt die Nukleinsäuresequenz der variable Region der schweren Kette dieses mAb. SEQ-ID 12 ist das hierdurch codierte Peptid. SEQ-ID 18 und 19 zeigen Aminosäuresequenzen der variablen Region eines humanisierten mAb 5.11A, und zwar der leichten Kette und der schweren Kette, respektive.

Die Erfindung betrifft schließlich auch Heilverfahren, bei welchen einer auf niedrige Regulator T-Zellzahlen bzw. hohe T-Lyphozyten-Infiltration in Organen oder Gewebe beruhenden Erkrankung, beispielsweise einer an GBS und/oder CDP leidenden Person, eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung in pharmakologisch wirksamer Dosierung und in für die Verabreichung geeigneter galenischer Herrichtung verabreicht wird.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert. Hierbei sind in den Figuren 1 bis 9 sowie den begleitenden Textteilen hierzu Verfahrensweisen und  
5 Ergebnisse gezeigt, die einerseits Zielstrukturen für die Findung geeigneter Wirksubstanzen darstellen und andererseits erfindungsgemäß einsetzbare Wirksubstanzen beschreiben. In den Figuren 10 bis 15 sind Ergebnisse dargestellt, die die Induktion regulatorischer T-Zellen  
10 durch erfindungsgemäß eingesetzte Wirksubstanzen belegen. In den Figuren 16 bis 21 sind Ergebnisse dargestellt, die die Wirkung erfindungsgemäßer Wirksubstanzen in einem Tiermodell, der experimentellen allergischen Neuritis der LEW-Ratte (EAN) belegen. Bei der EAN handelt es sich um  
15 ein Modell für das humane GBS und der CDP (auch CIDP bzw. chronische inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie genannt). Es zeigen:

Fig. 1: Stimulation von T-Lymphozyten der Ratte mit  
20 verschiedenen CD28 spezifischen mAb (a: Costimulation, b: superagonistische Stimulation),

Fig. 2: einen Sequenzvergleich zwischen Maus, Ratte und Human CD28 im Bereich des C'-D Loops  
25 (eingekastelt),

Fig. 3: experimentelle Ergebnisse zur Lokalisierung der Bindungsstelle superagonistischer mAb am CD28 Moleküle der Ratte,  
30

Fig. 4: Bindung von verschiedenen human CD28 spezifischen mAb an CD28 (a) sowie costimulatorische (b) und

superagonistische (c) Aktivität der mAb aus Figur 4a,

Fig. 5: Bindungsversuche, die belegen, daß

5 superagonistische mAb spezifisch an das C'-D Loop binden,

Fig. 6: eine dreidimensionale Darstellung von CD28 mit Markierung des C'-D Loop,

10

Fig. 7: Experimente zur Aktivierung von Zellen mittels erfindungsgemäßer mAb,

Fig. 8: Darstellung der Sequenzen SEQ-ID 9 - 16 (a - h),

15 sowie der humanisierten variablen Domäne des Antikörpers 5.11A (leichte Kette: VLC5.11, i; schwere Kette: VHC5.11, j), SEQ-ID 18 - 19,

Fig. 9: Frequenz der CD4+CD25+ Zellen an der

20 Gesamtpopulation der CD4 Zellen einer Ratte, im Vergleich nach Behandlung mit einem superagonistischen CD28 spezifischen mAb und einem costimulatorischen mAb,

25 Fig. 10: phänotypische Charakterisierung von durch superagonistische CD28 spezifische mAb

induzierten CD4+CD25+ Zellen und Vergleich mit CD4+CD25- und CD4+CD25+ Zellen aus unbehandelten Kontrolltieren,

30

Fig. 11: Induktion der Proliferation von CD4+CD25+

T-Zellen durch superagonistische CD28 spezifische mAb in Zellkultur,

- Fig. 12: Weitere Phänotypisierung der gemäß Fig. 11 erhaltenen CD4+CD25+ T-Zellen,
- 5 Fig. 13: inhibitorische Funktion der regulatorischen T-Zellen,
- Fig. 14: Experimente entsprechend Fig. 11 mit menschlichen T-Zellen und Einsatz superagonistischer human-CD28 spezifischer mAb,
- 10
- Fig. 15: Krankheitsverlauf der aktiven EAN unter Behandlung mittels superagonistischer CD28 spezifischer mAb im Vergleich mit costimulatorischen mAb,
- 15
- Fig. 16: Wirkung gegen EAN durch Gabe superagonistischer CD28 spezifischer mAb vor der Immunisierung mit dem EAN induzierenden Autoantigen,
- 20
- Fig. 17: Behandlung entsprechend Fig. 15, jedoch mit abweichendem Behandlungsplan,
- Fig. 18: Behandlung entsprechend Fig. 15, jedoch für den Fall der passiven bzw. adoptiv-Transfer EAN,
- 25
- Fig. 19: Sortierung humaner CD4+ Zellen in CD4+CD25+++ und CD4+CD25- T-Zellen,
- 30 Fig. 20: Wachstumskurven von durch erfindungsgemäße monoklonale Antikörper und IL-2 expandierten T-Zellen aus Fig. 19 (sortiert),

Fig. 21; CTLA-4 Expression der expandierten T-Zellen aus Fig. 20,

Fig. 22: Funktionelle Analyse der expandierten T-Zellen aus Fig. 20 mittels eines Suppressions-Assays, A: Proliferation der Indikatorzellen ohne und mit Stimulation (CD3/anti CD28), B: Unterdrückung der Proliferation der Indikatorzellen in Anwesenheit expandierter CD4+CD25+++ T-Zellen.

10

Fig. 1 zeigt die Stimulation frisch isolierter T-Lymphozyten der Ratte in Form eines 3H-Thymidin-Einbaus. Die Methodik entspricht jener, wie in der Literaturstelle WO98/54225 beschrieben, auf welche hier und folgend vollumfänglich Bezug genommen wird und deren Offenbarungsinhalt hiermit in den vorliegenden Text inkorporiert wird. In der Fig. 1a ist die Costimulation gezeigt, d. h. in allen Näpfen waren T-Zellrezeptor (TCR)-spezifische mAb an die Plastikoberfläche gebunden. Mangels Costimulation zeigt die Negativkontrolle (oberste Reihe) keinen Einbau. Costimulation wird sodann durch die Zugabe CD28-spezifischer mAb in löslicher Form gegeben. Zum Einsatz kam die gesamte gezeigte Palette CD28-spezifischer mAb. Diese Serie von verschiedenen CD28-spezifischen mAb stammt aus einem in WO98/54225 bereits beschriebenen Ansatz der Immunisierung und Herstellung von Hybridom-Zelllinien. Es handelt sich um Kulturüberstände, die genug CD28-spezifische mAb für eine sättigende Bindung an  $2 \times 10^5$  T-Zellen enthielten. Der Figur 1a ist entnehmbar, daß sämtliche dieser mAb in der Lage sind, costimulierend zu aktivieren, d.h. in Anwesenheit der anti-TCR mAb den Thymidin-Einbau



anzuregen. In Fig. 1b ist die Stimulation in Abwesenheit TCR-spezifischer mAb gezeigt. Auch dieses Experiment wurde so durchgeführt, wie in der Literaturstelle WO98/54225 beschrieben. Man erkennt, daß nur zwei mAb in der Lage  
5 sind, in Abwesenheit eines TCR-Signals die T-Lymphozyten zu stimulieren. Diese mAb besitzen also superagonistische Aktivität.

Im Weiteren wurde untersucht, ob costimulatorische und  
10 superagonistische CD28-spezifische mAb an unterschiedliche Bereiche des CD28-Moleküls binden. Die mAb wurden durch Immunisierung von Mäusen mit CD28 der Ratte hergestellt; erwartungsgemäß reagieren sie deshalb alle nicht mit Maus CD28 (nicht gezeigt). Da die mAb also nur solche Bereiche  
15 des Ratten CD28-Moleküls erkennen können, die sich von dem der Maus unterscheiden, wurde zunächst ein Sequenzvergleich zwischen CD28 der Maus und der Ratte vorgenommen (siehe Fig. 2, oberer Teil). Die Unterschiede zwischen beiden Spezies sind hervorgehoben. Zur Benennung  
20 der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Als Prototypen für einen konventionellen Ratten-CD28-spezifischen mAb wurde JJ319, für einen superagonistischen mAb wurde JJ316 verwendet (siehe WO98/54225).

25

In Figur 3 ist die Kartierung der Bindung gezeigt. Es wurden Expressionsplasmide konstruiert, in denen ein Teil der extrazellulären Domäne von CD28 aus der Maus, ein anderer aus der Ratte stammt. Dies ist jeweils symbolisch  
30 durch Balken bzw. Striche dargestellt; rechts daneben ist die Bindung der mAb JJ316 und JJ319 an Maus-Fibroblasten (L929-Zellen) gezeigt, die mit diesen Expressionsplasmiden transfiziert worden waren. In den ersten beiden Zeilen der

Abb. 3 (m/r und r/m 1-37) wird die Bindung beider Antikörper zur "rechten" Hälfte der Sequenz kartiert: Beide binden, wenn diese aus der Ratte stammt; Im umgekehrten Konstrukt (rm CD28 1-37, links Ratte, rechts Maus) findet keine Bindung statt. In der dritten Zeile (m/r CD28 1-66) wird gezeigt, dass JJ316 nicht mehr bindet, während der noch vorhandene Teil der Rattensequenz ("rechts") für die Erkennung durch JJ319 noch ausreicht. Demnach erkennen die beiden mAb unterschiedliche Epitope auf dem CD28-Molekül, und die Bindung des Superagonisten JJ316 muss folglich in dem Bereich zu suchen sein, der in dem Konstrukt der ersten Zeile, nicht aber in dem Konstrukt der dritten Zeile aus der Ratte stammte. Klarer Kandidat dafür ist der in Figur 2 eingekastelte Bereich.

15

In den Zeilen 4 und 5 der Figur 3 wurden deshalb zunächst zwei und dann drei Aminosäuren in diesem Bereich des Maus CD28-Moleküls so verändert, dass sie nun die Rattensequenz darstellen. Durch diese "Transplantation" von nur drei Aminosäuren konnte die Bindungsfähigkeit für mAb JJ316, nicht aber (wie erwartet) die von JJ319 übertragen werden. In Tab. 1 sind die Bindungsdaten für die ganze Palette CD28-spezifischer mAb zusammengefasst. Es ergibt sich eine eindeutige Korrelation: Die beiden mAb, die auch ohne TCR-Stimulation funktionieren (Superagonisten) erkennen das besagte ("eingekastelte", Figur 2) Epitop, die konventionellen (nur costimulatorischen) mAb dagegen nicht. Ein costimulatorischer mAb (5S35) erkennt das eingekastelte Epitop sehr schwach und bindet sehr stark an das "konventionelle" Epitop.

Die nächsten Figuren beschäftigen sich mit superagonistischen human-spezifischen mAb. Auch diese

wurden in Mäusen hergestellt, reagieren also nicht mit dem CD28-Molekül der Maus. Die Mäuse wurden mit human-CD28-transfizierten A20/J Maus B-Lymphomzellen immunisiert (siehe WO98/54225) und zusätzlich vor der Fusion mit käuflich erhältlichem human CD28-FC Fusionsprotein geboostert (von R und D Systems gekauft). In einer Serie von Fusionsexperimenten wurden aus mehreren Tausend Zelllinien ca. 20 identifiziert, die human-CD28 spezifische mAb produzieren (Bindung an Maus L929 Zellen, die human-CD28 exprimieren, aber nicht an untransfizierte L929 Zellen), analog zum Screen in der Literaturstelle WO98/54225. Von diesen zeigten zwei die gesuchte superagonistische Aktivität (9D7 und 5.11A), während alle neuen mAb konventionelle costimulatorische Aktivität besitzen. Im Weiteren werden insbesondere die beiden superagonistischen mAb beschrieben. Als Beispiel für einen konventionellen human-CD28-spezifischen mAb wird der ebenfalls neu generierte mAb 7.3B6 verwendet.

Figur 4a zeigt, dass die verwendeten Präparate der drei neuen mAb vergleichbar gut und auch mit vergleichbarem Titer an menschliche T-Lymphozyten binden. Gezeigt ist ein Experiment, in dem frisch isolierte mononukleäre Zellen aus dem menschlichen Blut (sog. PBMC) zunächst mit verschiedenen Verdünnungsstufen der eingesetzten mAb auf Eis behandelt wurden; dann wurde gewaschen und der gebundene mAb durch einen Fluoreszenz-Farbstoff markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht, der spezifisch die gebundenen Maus mAb erkennt. Durch Verwendung eines weiteren mAb, der menschliche CD4 T-Zellen detektiert und an den ein zweiter Fluoreszenz-Farbstoff gebunden war, konnte die Bindung der titrierten mAb durch elektronisches gating selektiv für CD4 T-Lymphozyten bestimmt werden.

Angegeben ist mit "MFI" die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, die ein Maß für die Menge des gebundenen CD28-spezifischen mAb darstellt. Die Konzentrationen stellen 3-fach Verdünnungen eines  
5 standardisierten Ausgangspräparats dar. Es ist durchaus normal, dass bei diesem Test die höchste Konzentration ein schwächeres Signal gibt als die folgenden Titrationsschritte; dies hat mit der Avidität (bivalente Bindung) von mAb zu tun und spielt in den hier  
10 diskutierten Zusammenhängen keinerlei Rolle.

Die Figuren 4b und c vergleichen die Fähigkeiten superagonistischer human-CD28-spezifischen mAb mit jenen konventioneller CD28-spezifischer mAb - in An- und  
15 Abwesenheit eines TCR-Signals - frisch isolierte menschliche T-Zellen zum Wachstum zu stimulieren. Gezeigt ist wiederum ein 3H-Thymidin Einbau, wie vorstehend für die Ratte beschrieben. Für Figur 4b waren die Näpfe mit einem mAb beschichtet, der mit dem menschlichen  
20 TCR/CD3-Komplex reagiert. Es wurde also Costimulation gemessen. Man erkennt, daß die Proliferation ohne Costimulation mit einem der mAb ausbleibt (Negativkontrolle), alle drei Antikörper sind jedoch in der Lage, die Zellteilung zu stimulieren. Für Figur 4c  
25 wurde in Abwesenheit eines TCR/CD3-spezifischen mAb gearbeitet. Nur die Antikörper 9D7 und 5.11A konnten superagonistisch stimulieren.

Nachdem das Epitop für superagonistische mAb bei der Ratte  
30 definiert ist und zwei neue superagonistische mAb mit Spezifität für menschliches CD28 isoliert worden waren, wurde überprüft, ob diese mAb an die entsprechende Stelle des menschlichen CD28-Moleküls binden. Wie aus Figur 2

ersichtlich, unterscheiden sich die CD28-Moleküle der Maus und des Menschen in zahlreichen Positionen. Aufbauend auf der Kartierung des superagonistischen Epitops bei der Ratte wurde deshalb direkt geprüft, ob sich die

5 Bindungsstelle für das superagonistische Epitop auf menschlichem CD28 auf das CD28-Molekül der Maus durch "Transplantation" der fünf Aminosäuren dieses homologen Bereiches erreichen lässt. Die Ergebnisse sind in der Figur 5 gezeigt. Vor dem Hintergrund der homogen

10 dargestellten Maus-Sequenz für die extrazelluläre Domäne des CD28Moleküls (Mitte) sind als Striche die ausgetauschten (Maus zu human) Aminosäurepositionen dargestellt (unten). Die Zahlen an der Seite geben zusätzlich noch die einzelnen Positionen und Mutationen an

15 (F60V bedeutet z.B., dass an Position 60 das Phenylalanin der Maus durch ein Valin der menschlichen Sequenz ersetzt wurde). Daneben ist die Bindung der drei untersuchten mAb dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, erkennen zwar alle drei mAb menschliches CD28, nur die beiden mAb 9D7 und

20 5.11A reagieren jedoch mit dem Maus CD28-Molekül, dem die fünf Aminosäuren des menschlichen CD28 an der entscheidenden Stelle transplantiert worden waren. Angesichts der Vielfalt von Unterschieden ist diese gezielte Herstellung der Reaktivität überraschend und

25 bestätigt in vollem Maße die aus den Experimenten mit Ratten CD28 abgeleitete Erkenntnis, dass superagonistische mAb an eine bestimmte, nämlich diese Stelle des Moleküls binden müssen.

30 In Figur 6 ist ein dreidimensionales Modell des CD28-Moleküls gezeigt. Die neu identifizierte Bindungsregion ist hervorgehoben. Sie entspricht der eingekastelten Sequenz in Figur 2. Die extrazelluläre

Domäne von CD28 gehört strukturell zur sog. Immunglobulin-Superfamilie, die sich durch zwei übereinanderliegende  $\beta$ -Faltblätter als Grundstruktur auszeichnet. Die Beschriftung dieser Bänder erfolgt nach  
5 einem in der Literatur vorgegebenen Muster. Wichtig für die hier gezeigte Darstellung ist, dass die als Epitop für superagonistische CD28-spezifische mAb in Ratte und Maus identifizierte Region als "C'-D loop" bezeichnet wird. Es wurde also gezeigt, dass mAb mit Spezifität für den  
10 C'-D Loop des CD28-Moleküls superagonistische Aktivität besitzen, also im Sinne der Literaturstelle WO98/54225 zur Aktivierung von T-Lymphozyten eingesetzt werden können. Die superagonistische Aktivität C'-D Loop spezifischer mAb in Ratte und Mensch zeigt, dass es dabei nicht auf die  
15 Sequenz des Epitops, sondern auf seine Lage bzw. Form ankommt.

In den Experimenten der Fig. 7 wurde untersucht, ob erfindungsgemäße mAb nicht nur binden (siehe Figuren 3 und  
20 5), sondern ob auch tatsächlich eine Aktivierung erfolgt. Hierfür wurden T-Tumorzellen der Maus, BW, entweder mit dem Konstrukt der Figur 3, Zeile 5, (Ratten C'-D Loop Übertragung) oder mit dem Konstrukt der Figur 5, Zeile 3, (human C'-D Loop) transfiziert. Die Aktivierung dieser  
25 Zellen wird nicht durch Zellteilung gemessen (sie proliferieren ohnehin), sondern durch die Produktion des Zytokins IL-2. Figur 7 zeigt, daß ohne Stimulation keine IL-2 Produktion erfolgt (Negativkontrolle). Stimulation mit einem T-Zellrezeptor-spezifischen mAb induziert IL-2  
30 Produktion (Positivkontrolle). Figur 7a zeigt die Ergebnisse bei Einsatz des superagonistischen mAb JJ316 der Ratte, während Figur 7b Ergebnisse für den human C'-D Loop spezifischen mAb 5.11A zeigt. In beiden Fällen werden



die jeweiligen Zelllinien zur IL-2 Produktion stimuliert. Erwartungsgemäß erfolgt die Stimulierung jedoch nicht mittels "konventioneller" CD28 spezifischer mAb, da diese nicht nur nicht an das C'-D Loop bindet, sondern das  
5 Konstrukt überhaupt nicht erkennen können, weil sie für ratten- bzw. humanspezifische Sequenzen spezifisch sind, die in dem Konstrukt nicht enthalten sind.

In der Figur 9 sind Dot Plots gezeigt, bei denen jede  
10 gemessene Zelle durch einen Punkt dargestellt ist. Die phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen erfolgte dabei durch Kombination der Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD25. Hierzu werden die Zellsuspensionen mit entsprechend Fluoreszenzfarbstoff-  
15 markierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4 bzw. CD25 inkubiert, gewaschen und in einem Durchflußzytrophotometer auf Bindung dieser Antikörper untersucht. Die gezeigten Ergebnisse wurden drei Tage nach i.p. Injektion eines costimulatorischen (Fig. 9a, JJ319) oder superagon-  
20 istischen CD28 spezifischen mAb (Fig. 9b, JJ316) erhalten. Im Falle von JJ319 sind etwa 7% der CD4 T-Zellen auch CD25 positiv ( $4/(50+4)$ ), was nicht gezeigten Ergebnissen in unbehandelten Tieren entspricht. Dagegen sind nach Behandlung mit JJ316 ca. 20% CD4+CD25+ ( $10/(10+40)$ ). Zudem  
25 ist das Niveau der CD25 Expression weitaus höher als im Kontrolltier. Ein solch hohes Niveau ist charakteristisch für regulatorische T-Zellen.

Die Figur 10 zeigt eine phänotypische Charakterisierung in  
30 Darstellung als Histogramm. Dabei wurde in den Figuren 10a bis 10c der Marker CD45RC detektiert, eine hochmolekulare Isoform des CD45 Moleküls, welche auf naiven CD4 T-Zellen stark, auf stimulierten CD4 T-Zellen jedoch niedrig

exprimiert wird. Eine niedrige Expression ist für regulatorische T-Zellen typisch. Fig. 10a zeigt, daß CD4+CD25- Zellen aus unbehandelten Tieren CD45RC mehrheitlich stark exprimieren. Dagegen findet im Falle von CD4+CD25+ Zellen aus unbehandelten Tieren starke Expression nur in einer deutlichen Minderheit aller Zellen statt (Fig. 10b). Im Falle der Behandlung mit dem superagonistischen CD28 spezifischen mAb (Fig. 10c) ist die Herunterregulierung von CD45CD45RC noch weitaus stärker ausgeprägt als im Falle der Figur 10b. Im Falle der Figuren 10d bis 10e das von regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimierte CD152 (CTLA-4) durch Anfärbung detektiert. Diese Anfärbung muß aufgrund der intrazellulären Lokalisation von CD152 nach Permeabilisierung fixierter Zellen durchgeführt werden und ist deshalb mit einem unspezifischen Hintergrund behaftet. Zur Kontrolle hierauf wurde eine sogenannte Isotypenkontrolle mitgefahren, i.e. es wurde eine intrazelluläre Anfärbung mit einem mAb der gleichen Immunglobulinklasse, welcher jedoch nichts spezifisch erkennen kann, durchgeführt. Der spezifische CD152 Nachweis ergibt sich dabei als Verschiebung des CD152 Histogramms gegenüber dem Isotyp-Kontrollhistogramm. Man erkennt in Fig. 10d keine Verschiebung und folglich keine CD152 Expression in den CD4+CD25- Zellen. In den unbehandelten CD4+CD25+ Zellen ist eine schwache Verschiebung (Fig. 10e) und in den JJ316 (superagonistischer CD28 spezifischer mAb) behandelten Zellen eine stärkere Verschiebung erkennbar in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Figuren 10a bis 10c.

Im Ergebnis ist mit den Figuren 9 und 10 phänotypisch gezeigt, wie regulatorische T-Zellen identifizierbar sind, und daß superagonistische CD28 spezifische mAb in vivo regulatorische CD4 T-Zellen präferentiell vermehren bzw. 5 induzieren.

In der Figur 11 wurden CD4+CD25+ Zellen durch elektronische Zellsortierung entweder aus unbehandelten Ratten (Fig. 11a) oder aus mit JJ316 behandelten Ratten 10 (Fig. 11b) isoliert und in 96 Napfplatten gemäß dem Stand der Technik kultiviert. Zellvermehrung wurde durch 3H Thymidineinbau zwischen Tag 2 und 3 der Kultivierung gemessen. "(-)" bedeutet keine Stimulierung, Kostimulation bedeutet Stimulation mit einem nicht-superagonistischen 15 CD28 spezifischen mAb (JJ319) sowie mit dem TCR-spezifischen R73, und JJ316 zeigt die superagonistische Stimulation. Sowohl Fig. 11a als auch 11b zeigen, daß regulatorische T-Zellen schlecht auf Kostimulation, jedoch gut auf Stimulation mit einem 20 superagonistischen CD28 spezifischen mAb reagieren. Stimulation mit erfindungsgemäß eingesetzten mAb zeigt also auch in Zellkultur eine beachtliche Vermehrung regulatorischer T-Zellen.

25 Figur 13 zeigt eine Darstellung entsprechend Figur 10f, jedoch nach in vitro Stimulation mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316). Man erkennt eine noch stärker nachweisbare CD152 Expression.

30 In der Figur 13 ist die inhibitorische Funktion regulatorischer T-Zellen auf CD4+CD25- T-Zellen, welche als Indikatorzellen für den suppressorischen Effekt dienen, dargestellt. Als Stimulus für die CD4+CD25-

T-Zellen wurde Kostimulation (R73 + JJ319) verwendet. Gemessen wurde der <sup>3</sup>H Thymidineinbau zwischen Tag 2 und 3 der Kultivierung. CD25+ bedeutet elektronisch sortierte CD4+CD25+ T-Zellen aus drei Tage zuvor mit

5 superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Tieren. CD25- steht für die Indikatorzellen. CD25+/CD25- bedeutet in Fig. 13a, daß beide Zellpopulationen zu gleichen Teilen miteinander gemischt wurden. Man erkennt, daß die CD25+ Zellen auf

10 Kostimulation nicht mit Proliferation reagieren. Zudem wird zusätzlich die Proliferation von Indikatorzellen unterdrückt. In der Figur 13b ist eine Titration der regulatorischen T-Zellen durch Mischung mit Indikatorzellen in verschiedenen Mengenverhältnissen

15 dargestellt. Man erkennt, daß selbst bei einem Verhältnis regulatorischer zu Indikatorzellen von 1:16 noch Suppression zu beobachten ist. Dies zeigt die hohe Effektivität der mit erfindungsgemäß verwendeten mAb stimulierten regulatorischen Zellen.

20

Figur 14 zeigt einen Vergleich der Reaktionen humaner CD4+CD25- T-Zellen (naïve Zellen) zu CD4+CD25+ T-Zellen (regulatorische Zellen) in Antwort auf Kostimulation (anti-CD3 + konventionelle anti-CD28 mAb) bzw. auf

25 human-spezifische superagonistische CD28 spezifische mAb (9D7 und 5.11A). Die Versuche entsprechen jenen, wie vorstehend für die Ratte beschrieben. Von links beginnend zeigen die ersten drei Gruppen unstimulierte Kontrollen (kein <sup>3</sup>H Thymidineinbau). Es handelt sich dabei um die

30 gesamten CD4+ T-Zellen, dann die durch Sortierung gewonnene CD25- Fraktion und schließlich die durch Sortierung gewonnene CD25+ Fraktion. "med" bedeutet Medium. Hieran schließen sich zwei Gruppen an, bei welchen

superagonistisch stimuliert wurde (9D7 und 5.11A). Man erkennt, daß die regulatorischen T-Zellen auf die Stimulation mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb im Vergleich zur Gesamtpopulation der CD4+ Zellen und ihrer CD25- Fraktion besser reagieren. Die letzte Dreiergruppe zeigt die Ergebnisse der konventionellen Kostimulation. Hier ist demgegenüber die Reaktion der ungetrennten T-Zellen sowie der CD25- Fraktion eher besser.

10

Im Ergebnis ist sowohl für Ratten T-Zellen als auch im humanen System belegt, daß superagonistische CD28 spezifische mAb regulatorische T-Zellen besser induzieren bzw. vermehren als konventionelle Kostimulation. Weiterhin ist belegt, daß dies auch im intakten Organismus verifiziert werden kann.

In Figur 15 ist der Krankheitsverlauf der aktiven EAN unter Behandlung mit verschiedenen mAb dargestellt. Verwendet wurden 7-8 Wochen alte weibliche LEW Ratten erhältlich vom Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden mit einem synthetischen Peptid immunisiert, welches einem Teil des Myelinproteins P2, das periphere Nervenfasern umhüllt, entspricht (Aminosäuren 53-78 des bovinen P2 Proteins, 50µl einer 0,5mg/ml Lösung, Inokulation in den Fußballen). Nach ca. 10 Tagen entwickelt sich eine progressive Lähmung, welche nach einem standardisierten Scoring (King et al., Exp Neurol, 87:9-19 (1985) quantifiziert werden kann. Figur 15a zeigt eine präventive Therapie mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) und Figur 15b Behandlung mit konventionellen mAb (JJ319). Die Applikation erfolgte in 1mg/Tier Dosen i.p. entweder am Tag der P2 Immunisierung

(D0), am Tag 12 (D12), i.e. nach Beginn der Symptome, oder an beiden Tagen. Die verschiedenen Gruppen umfaßten 3 bis 6 Tiere. Ein Vergleich der Figuren 15a und 15b zeigt, daß die Behandlung mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb deutlich wirksamer ist als eine Behandlung mit konventionellen mAb.

Figur 16 zeigt Ergebnisse entsprechend der Figur 15, jedoch bei einer prophylaktischen Behandlung. d-7 ist Behandlung 7 Tage vor der Immunisierung, d-21 21 Tage vor der Immunisierung. Es ist erkennbar, daß ein resistenter Status durch Vermehrung regulatorischer T-Zellen bei Behandlung innerhalb einer Woche vor Immunisierung erreichbar ist, jedoch nicht bei Behandlung 3 Wochen vor der Immunisierung.

Figur 17 beruht auf einer Vorgehensweise, wie bei Figur 15, jedoch Behandlung mit JJ316 am Tage 0 sowie 4. Figur 17a zeigt den Krankheitsverlauf entsprechend der Darstellung der Figur 15a. Die Figur 17b zeigt elektrophysikalische Eigenschaften, nämlich Geschwindigkeit der Reizleitung als direkter klinischer Parameter für die Schädigung des Ischiasnerves. Die Messungen wurden entsprechend der Literaturstellen Adlkofer et al., Nat Genet, 11:274-280 (1995) und Heininger et al., Ann Neurol, 19:44-49 (1986) durchgeführt. Man erkennt den pathologischen Befund anhand der Kontrollgruppen insbesondere in der Verlängerung der N1 und F-Latenzen (siehe Tage 0 und 12, offene Symbole). Demgegenüber bleiben die Latenzen im Falle der mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Tieren zwischen Tag 0 und Tag 12 nahezu unverändert (gefüllte Symbole).



Nicht dargestellt sind ergänzende Untersuchungen, mit histologischem Nachweis der T-Zellinfiltration in Dünnschichten der Nerven. Der Nachweis der T-Zellen erfolgt mit einem für diese Technik geeigneten mAb, 5 nämlich B115 und Färbung der T-Lymphozyten. Die Zellkerne wurden andersfarbig gegengefärbt. In Vergleichsversuchen wurde festgestellt, daß in der nicht behandelten Kontrollgruppe eine höhere Zahl von T-Zellen infiltriert waren als in der mit einem superagonistischen CD28 10 spezifischen mAb (JJ316) behandelten Gruppe, was auf eine Suppression durch regulatorische T-Zellen durch Einsatz erfindungsgemäßer mAb hindeutet.

Ebenfalls nicht gezeigt sind Experimente, in denen die 15 isolierenden Myelinscheiden angefärbt wurden. Behandlung mit superagonistischen CD28 spezifischen mAb zeigte ein gesundes Bild, während die Kontrollgruppe Demyelinisierung, i.e. Zerstörung der isolierenden Myelinschichten, zeigte.

20

In der Figur 18 sind Ergebnisse einer Therapie der passiven oder adoptiv-Transfer EAN (AT-EAN) dargestellt. Diese wird nicht durch Immunisierung mit dem Nervenantigen, wie vorstehend beschrieben, induziert, 25 vielmehr erfolgt eine intravenöse Injektion eines autoreaktiven CD4+ T-Zellklons mit Spezifität für das P2 Myelinantigen ( $8 \times 10^6$ , Zelllinie G7) gemäß der Literaturstelle Stienekemeier et al., Brain, 122:523-535 (1999). Figur 18a zeigt den Krankheitsverlauf einer 30 Kontrollgruppe, bei Behandlung mit JJ316 am Tag 1 (d1) und bei Behandlung am Tag 3 (d3). Beachtlich ist, daß selbst nach Beginn der Krankheitssymptome, i.e. Behandlung am Tag 3, die Krankheit gestoppt werden kann. In der Figur 18b

ist für die drei Gruppen die Infiltration der Nerven mit T-Zellen quantifiziert worden und man erkennt, daß in der Kontrollgruppe dies zur Schädigung des Nerven führt. Dagegen sind die T-Zellzahlen bei Behandlung mit  
5 erfindungsgemäß eingesetzten mAb erheblich niedriger aufgrund der Induktion regulatorischer T-Zellen.

In den Experimenten der Figuren 19 bis 22 ist schließlich belegt, dass mittels erfindungsgemäßer monoklonaler  
10 Antikörper expandierte CD4+CD25+++ T-Zellen auch nach der Expansion ihre funktionellen Eigenschaften, z.B. die Unterdrückung der Proliferation "konventioneller" T-Zellen, aufrecht erhalten können. Zu diesem Zwecke wurden aus humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMC)  
15 die CD4+ T-Zellen mittels Magnetseparation gereinigt (negative Depletion von CD8+, CD11b+, CD16+, CD19+, CD36+ und CD56+ Zellen; Reinheit 95%). Diese Zellen wurden dann mit einem CD25-spezifischen Antikörper und nachfolgend einem PE-konjugierten Sekundärantikörper beladen, in  
20 CD4+CD25+++ und CD4+CD25- T-Zellen sortiert (siehe Figur 19) und nach Zugabe von an Dyna-beads gekoppelten erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern (hulG4) und Interleukin 2 (IL-2) kultiviert (Tag 0). Am Tag 5 erfolgte eine Färbung der expandierten Zellen mit anti-CD4 und anti  
25 CD-25 an der Zelloberfläche, sowie intracellulär mit anti-CTLA-4 und Ki-67. Am Tag 6 erfolgte eine Trennung der Beads von den kultivierten Zellen und Entfernung des IL-2 durch wiederholtes Waschen, gefolgt von 2-tägiger Kultur nur in Medium. Die zwei Subpopulationen vermehrten sich  
30 innerhalb von 8 Tagen um das zehnfache (siehe Figur 20). Die verstärkte Expression des Proteins CTLA-4 in den expandierten CD4+CD25+++ Zellen (siehe Figur 21) ist bereits indiziell dafür, dass diese Zellen ihren

regulatorischen Phänotyp beibehalten hatten. Dies wurde anschließend wie folgt durch eine funktionelle Charakterisierung verifiziert.

5 Syngene periphere mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Vollblut wurden gewonnen und mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE (Carboxy Fluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) markiert. Diese Zellen dienten als Indikatorzellen. Sie wurden zunächst mit anti CD3 und anti CD28 Antikörpern  
10 drei Tage lang stimuliert. Mit jeder Zellteilung halbierte sich die Intensität der Markierungsmesswerte dieser Indikatorzellen (siehe Figur 22a). In unabhängigen Ansätzen wurden am Tag 8 expandierte CD4+CD25+++ bzw. CD4+CD25- T-Zellen mit den CFSE markierten Indikatorzellen  
15 in Verhältnis 1:1 bzw. 1:5 gemischt und kokultiviert (Stimulation mit anti-CD3 mAK, Klon HIT3a, Endkonzentration 0,1 µg/ml, sowie anti-CD-28 mAK, Klon CD28.2, Endkonzentration 0,05 µg/ml). Figur 22b zeigt, dass die Anzahl der Zellteilungen in den Indikatorzellen  
20 durch die Anwesenheit der expandierten CD4+CD25+++ T-Zellen stark reduziert wurde, während die CD4+CD25- T-Zellen nur einen geringen Effekt zeigten. Somit ist belegt, dass die mit erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern expandierten regulatorischen CD4+CD25+++  
25 T-Zellen nach wie vor in der Lage waren, die Proliferation anderer "normaler" T-Zellen zu unterdrücken.

29

Tabelle I:

Bindung von anti-Ratten CD28 mAb an Maus- und Ratten CD28  
und verschiedene CD28 Mutanten.

5 mAb	Maus CD28	Ratten CD28	mCD28, S62P A64V, E65G	m/rCD28 Mval269I
Kontr.	-	-	-	-
JJ316	-	+++	+++	-
10 JJ319	-	+++	-	+++
5S28	-	++	-	++
5S38.17	-	+++	+++	-
5S247	-	+++	-	+++
5G40/3	-	+++	-	+++
15 5G87	-	++	-	++
5G111	-	++	-	++
5S35	-	+++	+	+++

20

25

30

## Patentansprüche:

1. Verwendung eines CD28-spezifischen superagonistischen  
5 monoklonalen Antikörpers (mAb) oder einer Mimikriver-  
bindung hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen  
Zusammensetzung zur Induktion und/oder Vermehrung regu-  
latorischer T-Zellen in vitro und/oder in vivo.
- 10 2. Verwendung insbesondere nach Anspruch 1 zur Behandlung  
und/oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen und/oder  
Entzündungsreaktionen.
- 15 3. Verwendung insbesondere nach Anspruch 1 zur Behandlung  
des Guillian-Barré-Syndroms (GBS) oder der chronischen  
demyelinisierenden Polyneuropathie (CDP).
- 20 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der  
mAb herstellbar ist indem ein nichtmenschliches Säuget-  
tier mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbeson-  
dere dem C'-D Loop, immunisiert wird, wobei aus dem  
25 nichtmenschlichen Säugetier Zellen entnommen und aus  
den Zellen Hybridomzellen hergestellt werden, und wobei  
die so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe selek-  
tiert werden, daß in deren Kulturüberstand mAb enthal-  
ten sind, die an CD28 superagonistisch binden.
- 30 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die  
Mimikriverbindung erhältlich ist in einem

- Screeningverfahren, wobei eine prospektive Mimikriverbindung oder eine Mischung von prospektiven Mimikriverbindungen einem Bindungsassay mit CD28 oder einer Teilsequenz hieraus, insbesondere dem C'-D-Loop, unterworfen werden, und wobei an CD28 oder an die Teilsequenz hieraus bindende Wirksubstanzen selektiert werden, ggf. gefolgt von einem Assay zur Prüfung auf superagonistische Stimulation von mehreren bis allen Untergruppen der T-Lymphozyten.
- 10
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der mAb erhältlich ist aus Hybridomzellen, wie hinterlegt unter den DSM Nummern DSM ACC2531 (mAb: 9D7 bzw. 9D7G3H11) oder DSM ACC2530 (mAb: 5.11A bzw. 5.11A1C2H3).
- 15
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der mAb oder die Mimikriverbindung eine oder mehrere der Sequenzen Seq.-ID 9, 11, 13 und/oder 15, oder eine oder mehrere Sequenzen Seq.-ID 10, 12, 14 und/oder 16, oder eine oder mehrere Sequenzen 18 und/oder 19, oder hierzu homologe Sequenzen enthält.
- 20
- 25
8. Verfahren zur Behandlung oder Prophylaxe einer Erkrankung nach Anspruch 2 oder 3, wobei entweder
- 30
- einem Patienten eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend einen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper oder eine Mimikriverbindung hierzu und galenisch hergerichtet für eine definierte



und angewandte Darreichungsform, beispielsweise i.v. Injektion, verabreicht wird, oder

5 einem Patienten eine Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, enthaltend T-Lymphozyten oder Vorläuferzellen hierzu entnommen wird, die Körperflüssigkeit, ggf. nach einer Aufbereitungsverfahrensstufe, mit einem CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper oder einer Mimikriverbindung hierzu versetzt  
10 wird und die so behandelte Körperflüssigkeit dem Patienten wieder dargereicht, beispielsweise i.v. injiziert, wird.

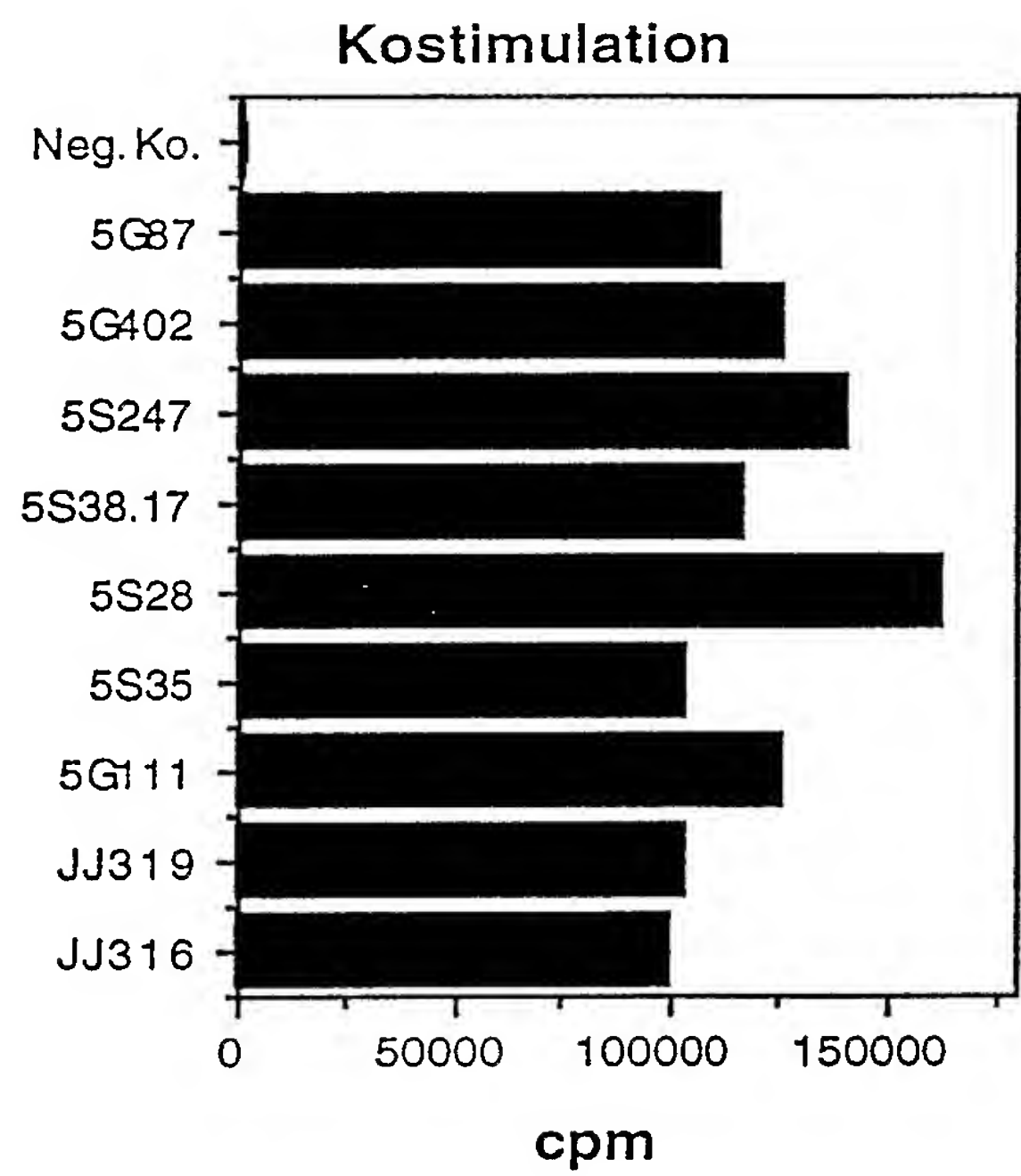
15

20

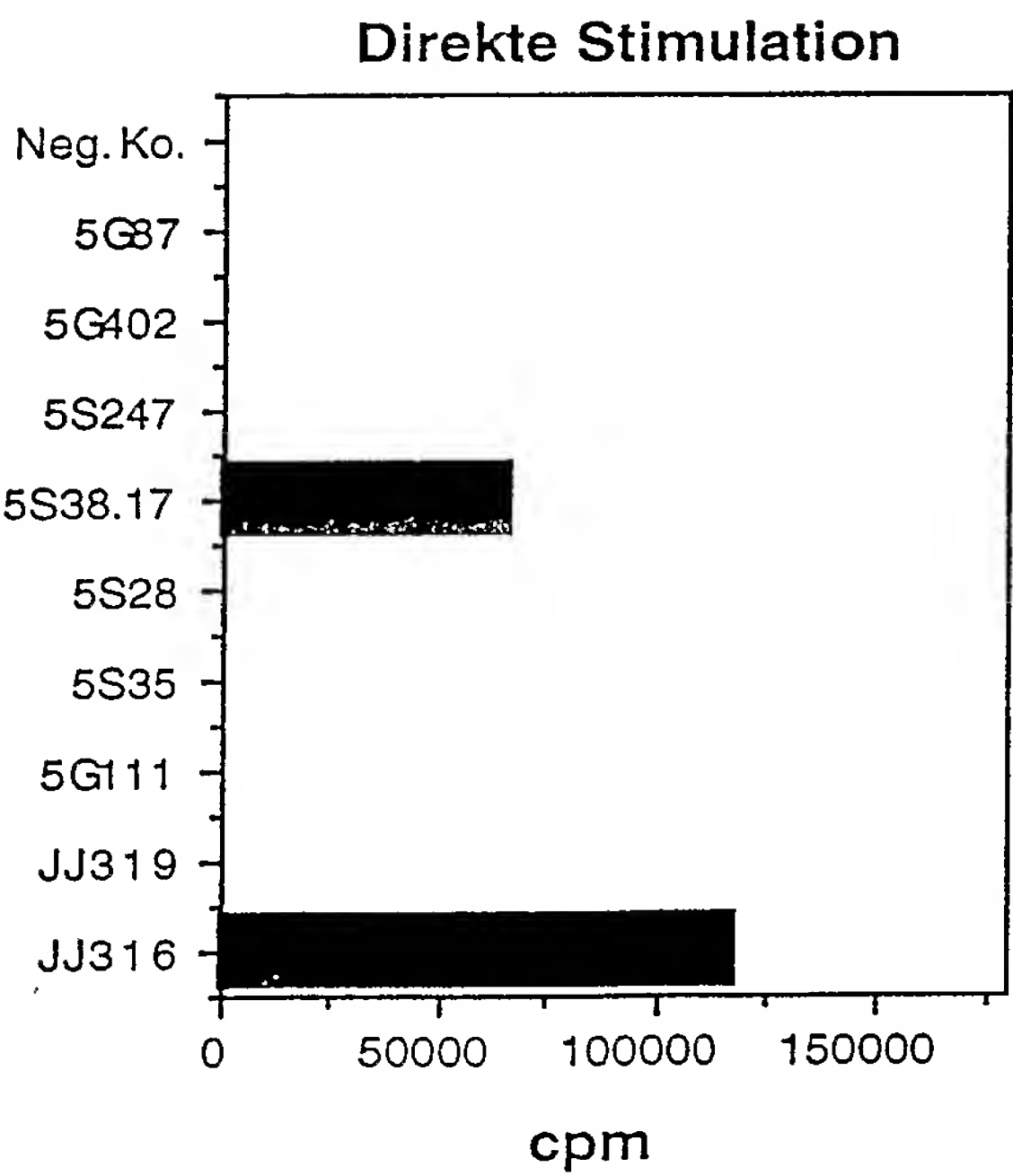
25

30

FIG. 1



a



b

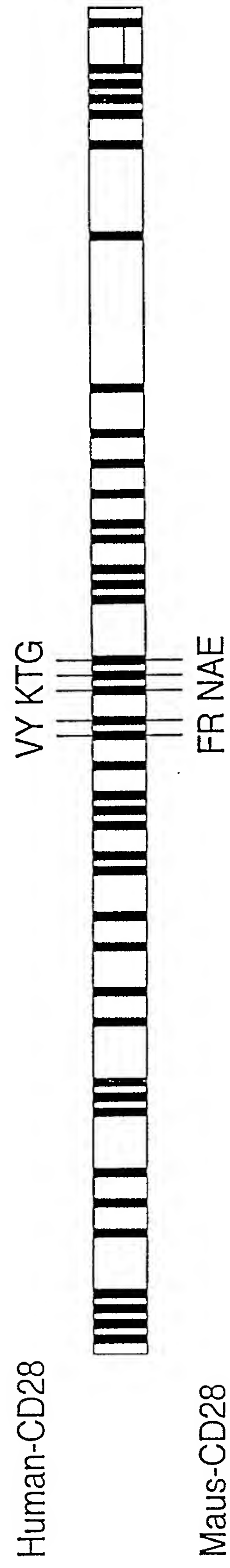
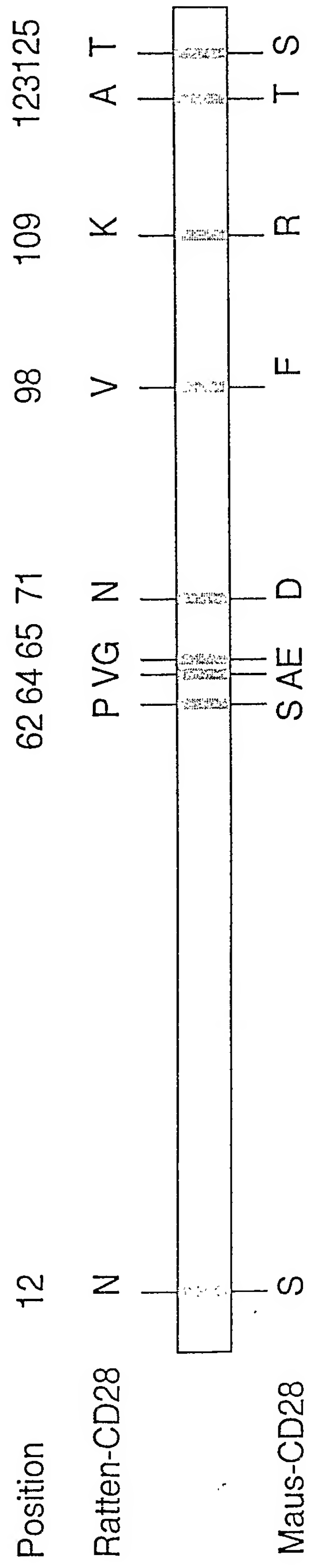



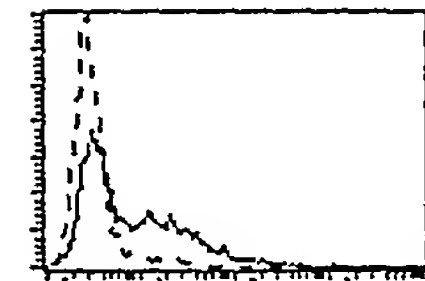
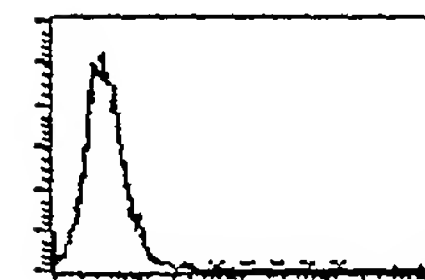
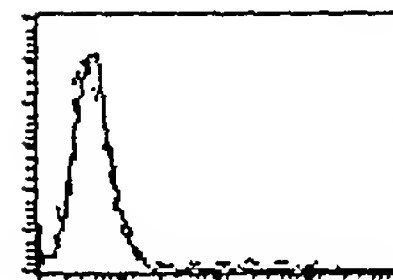
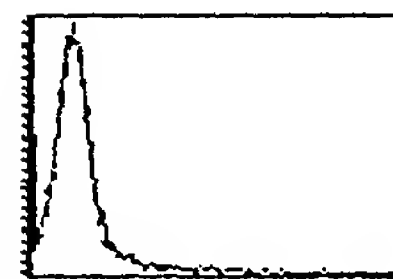
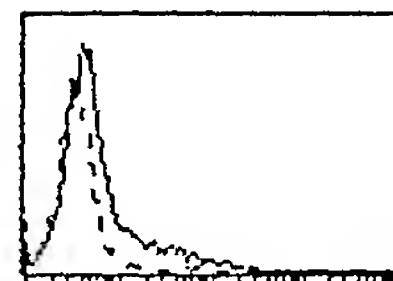
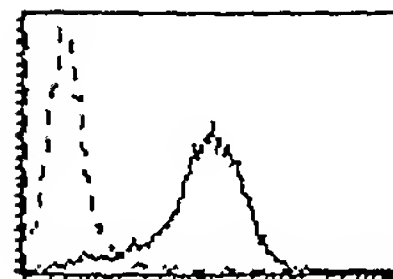
FIG. 2

FIG. 3

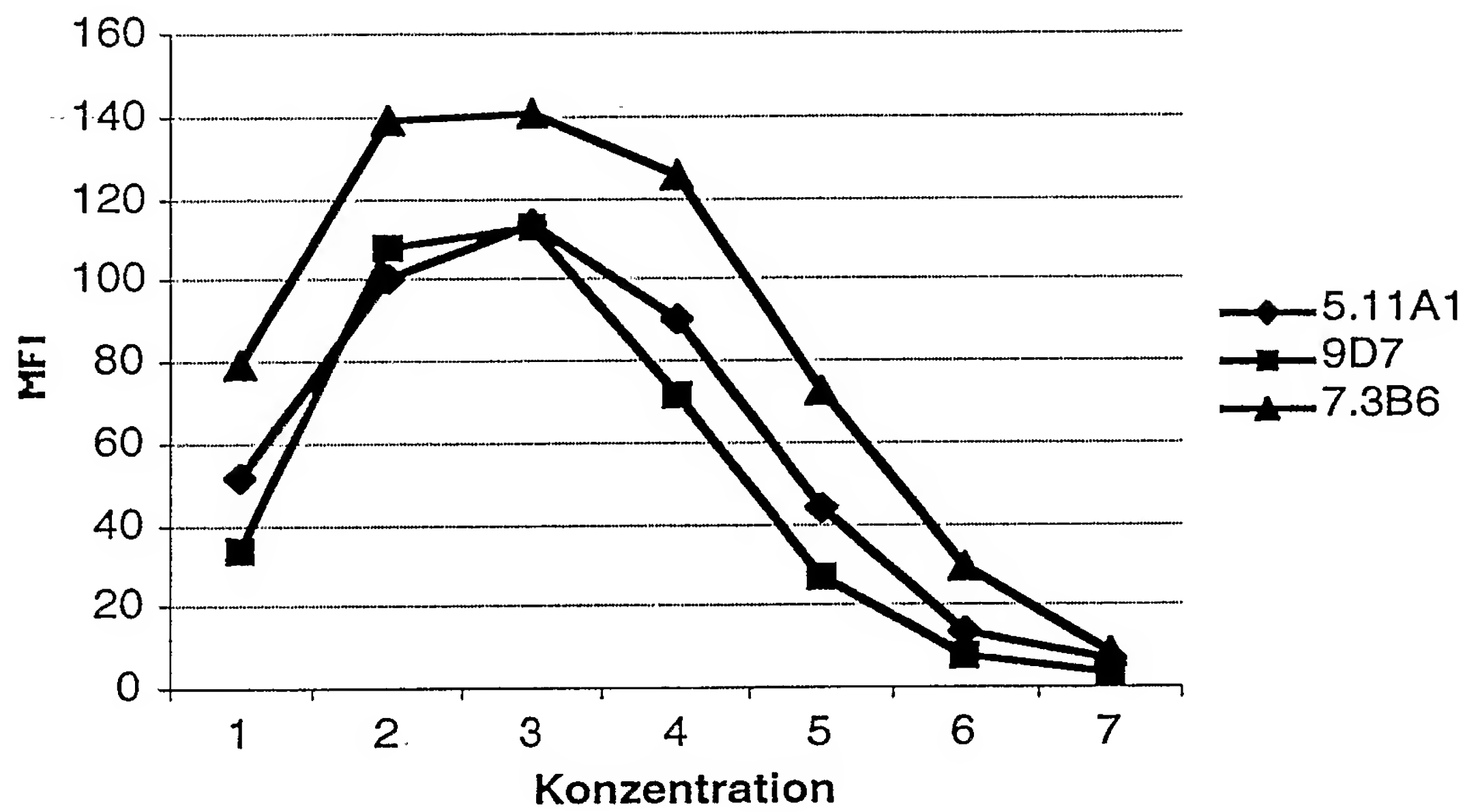
 = Maus = Rattem/r CD28  
1-37

JJ316

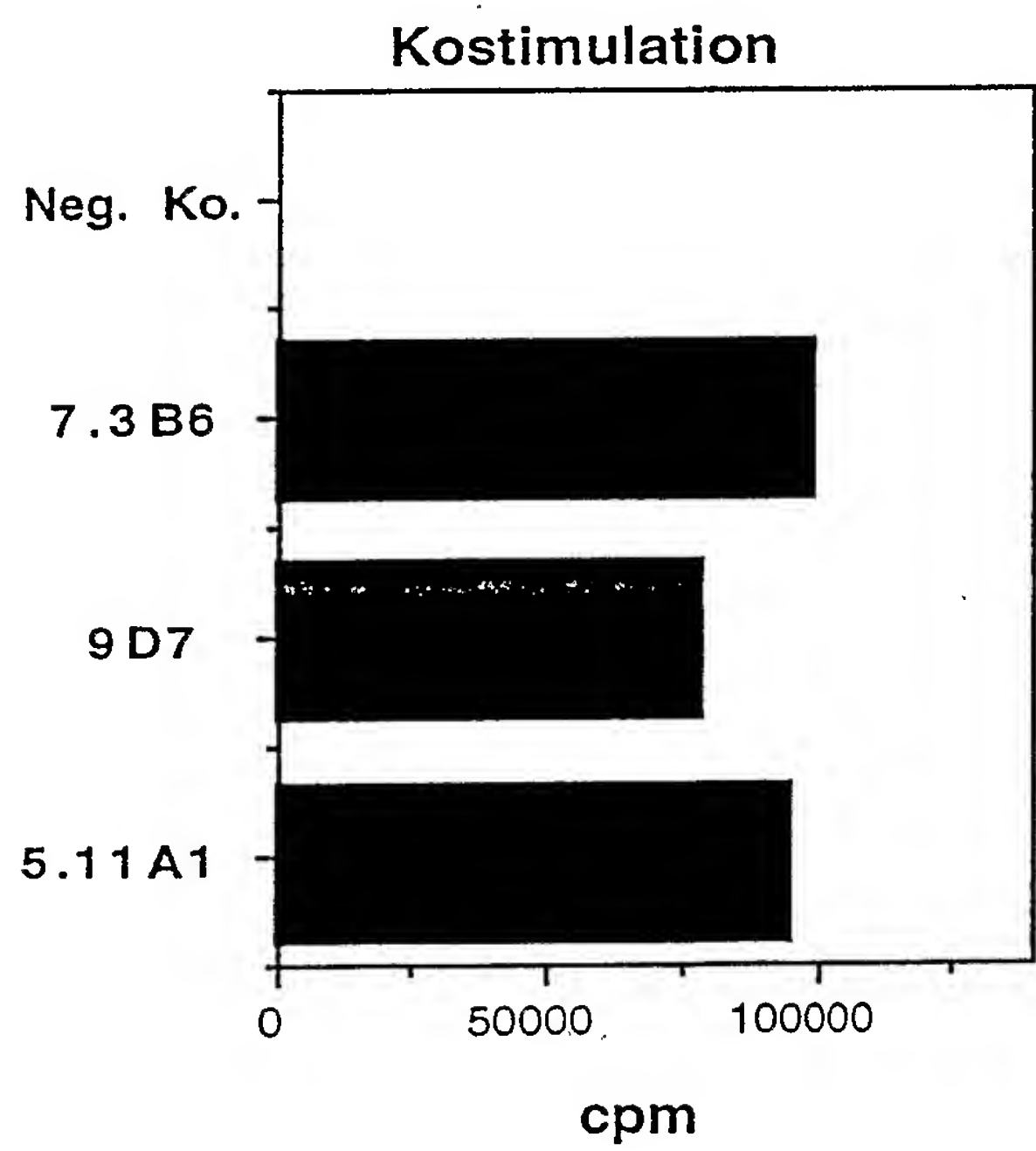
JJ319

r/m CD28  
1-37m/r CD28  
1-66m CD28  
A64V,  
E65Gm CD28  
S62P,  
A64V, E65G

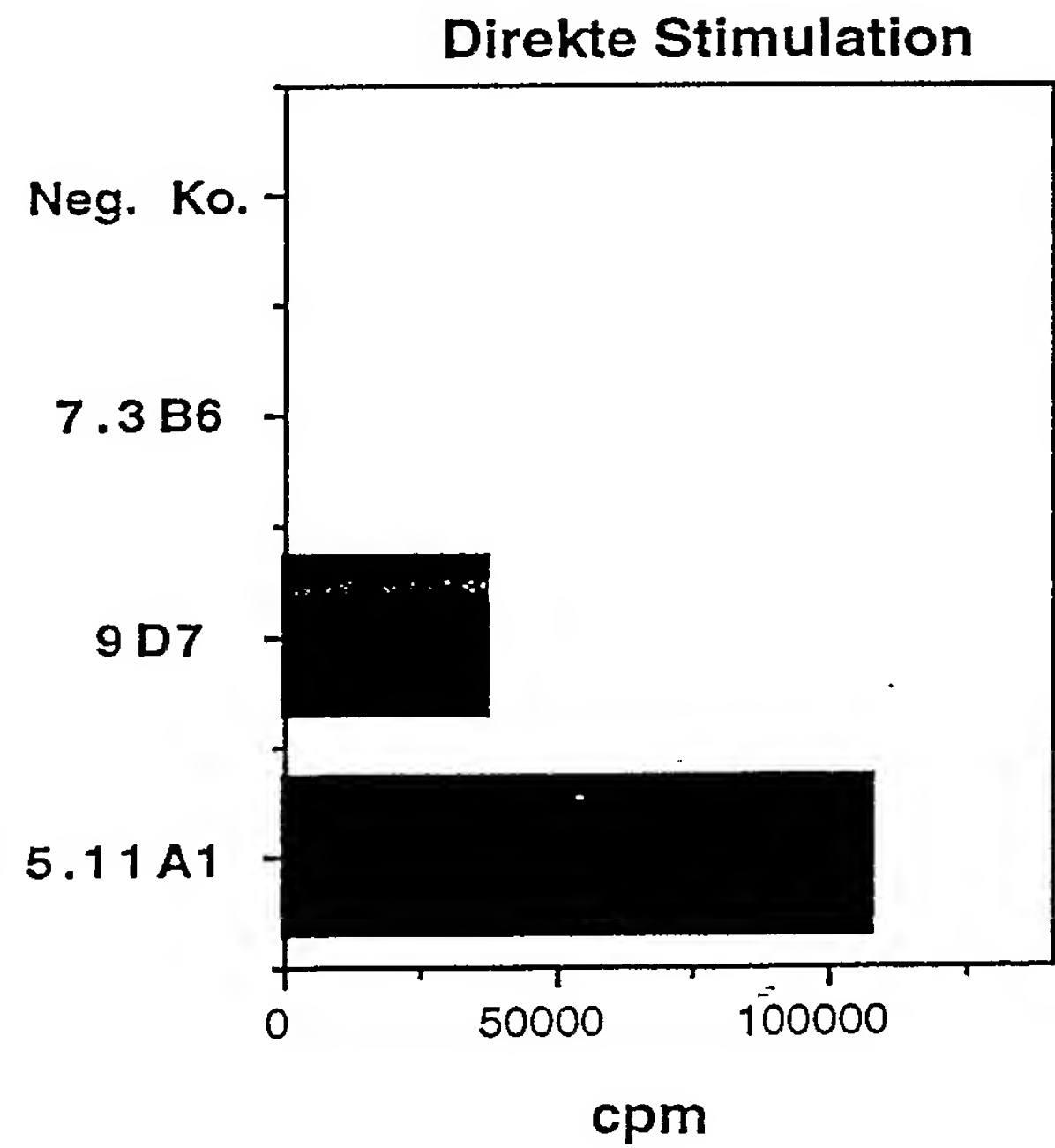
4/31  
FIG. 4



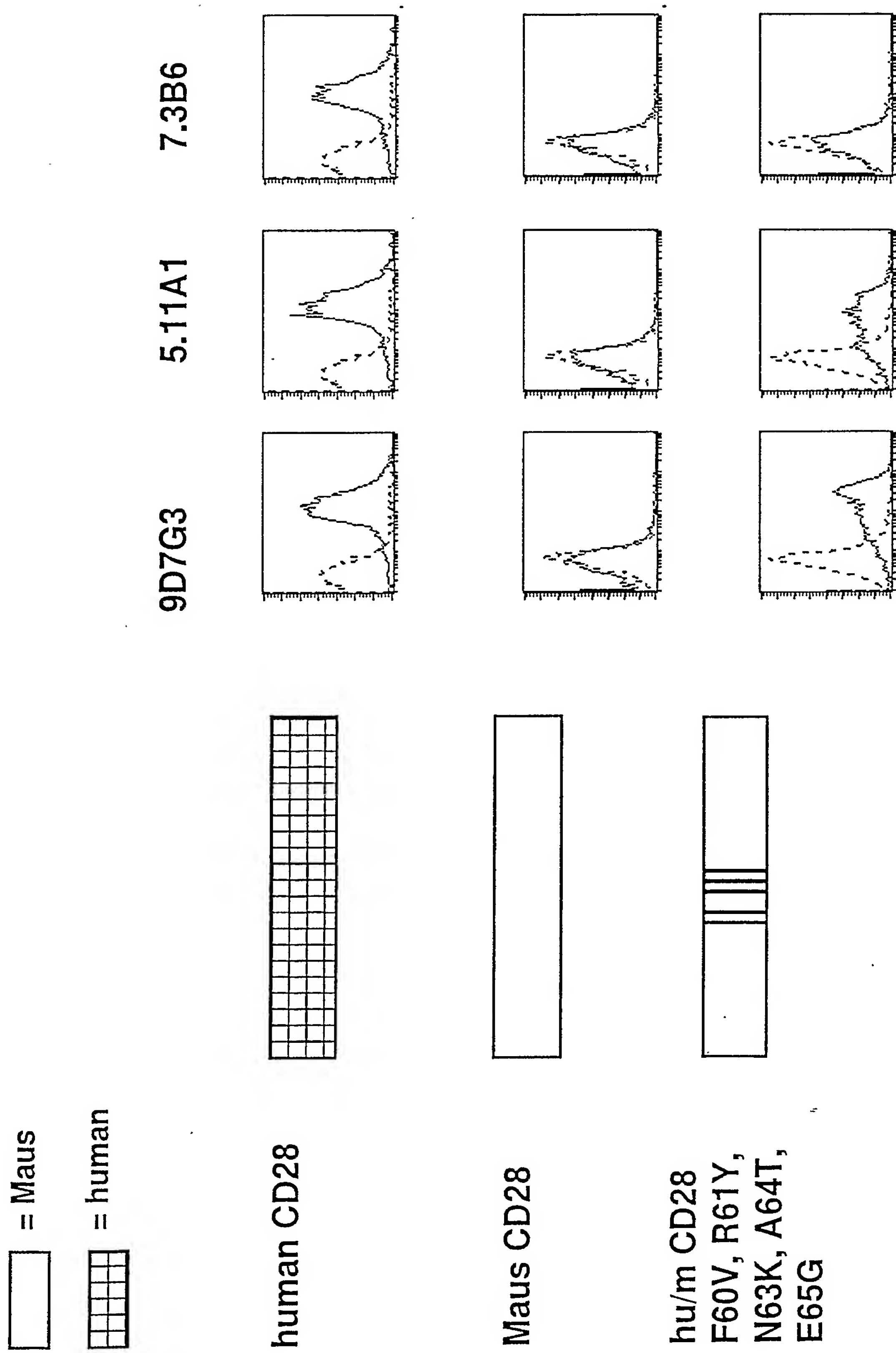
a



b



c



5  
G.  
F



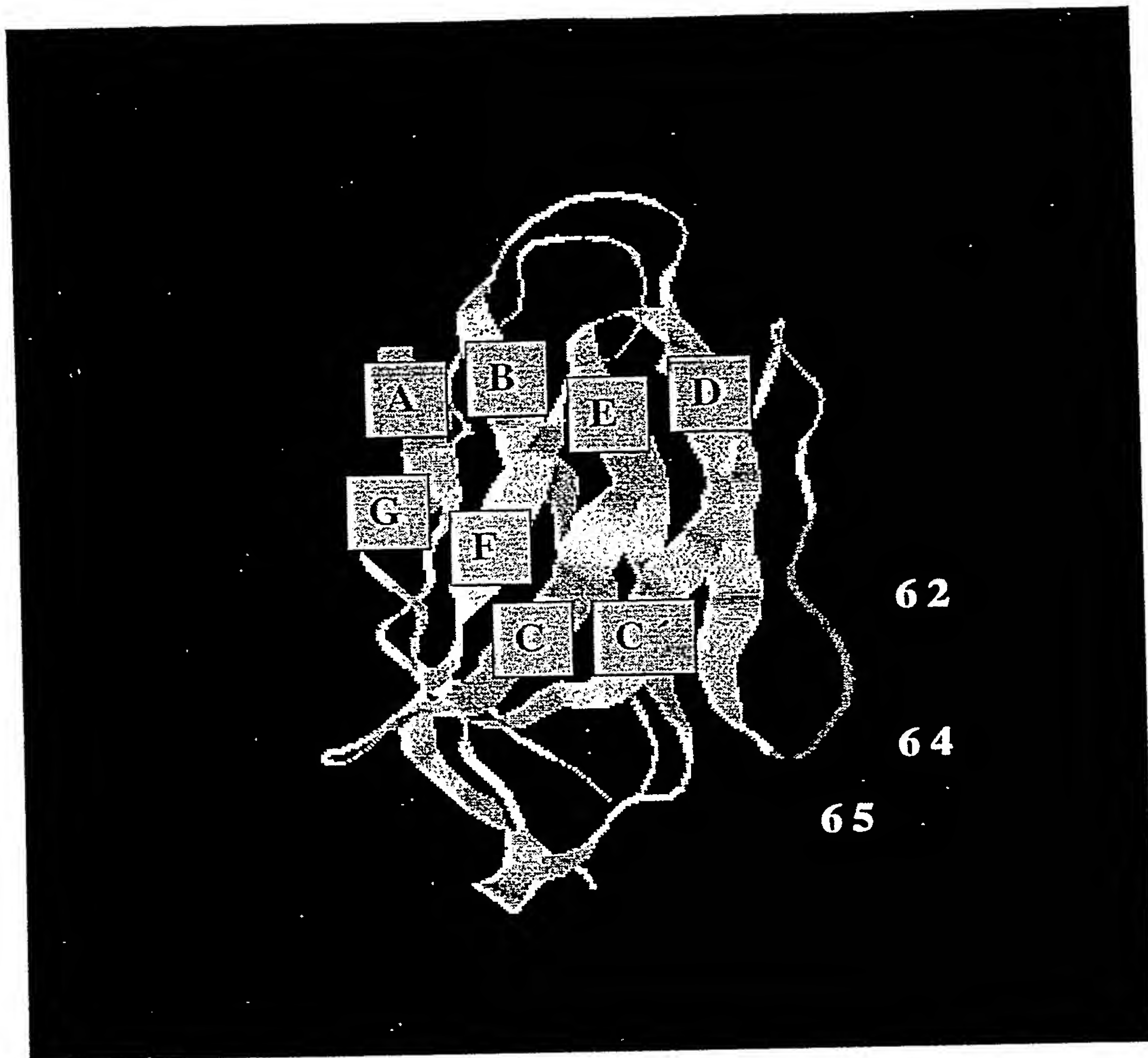
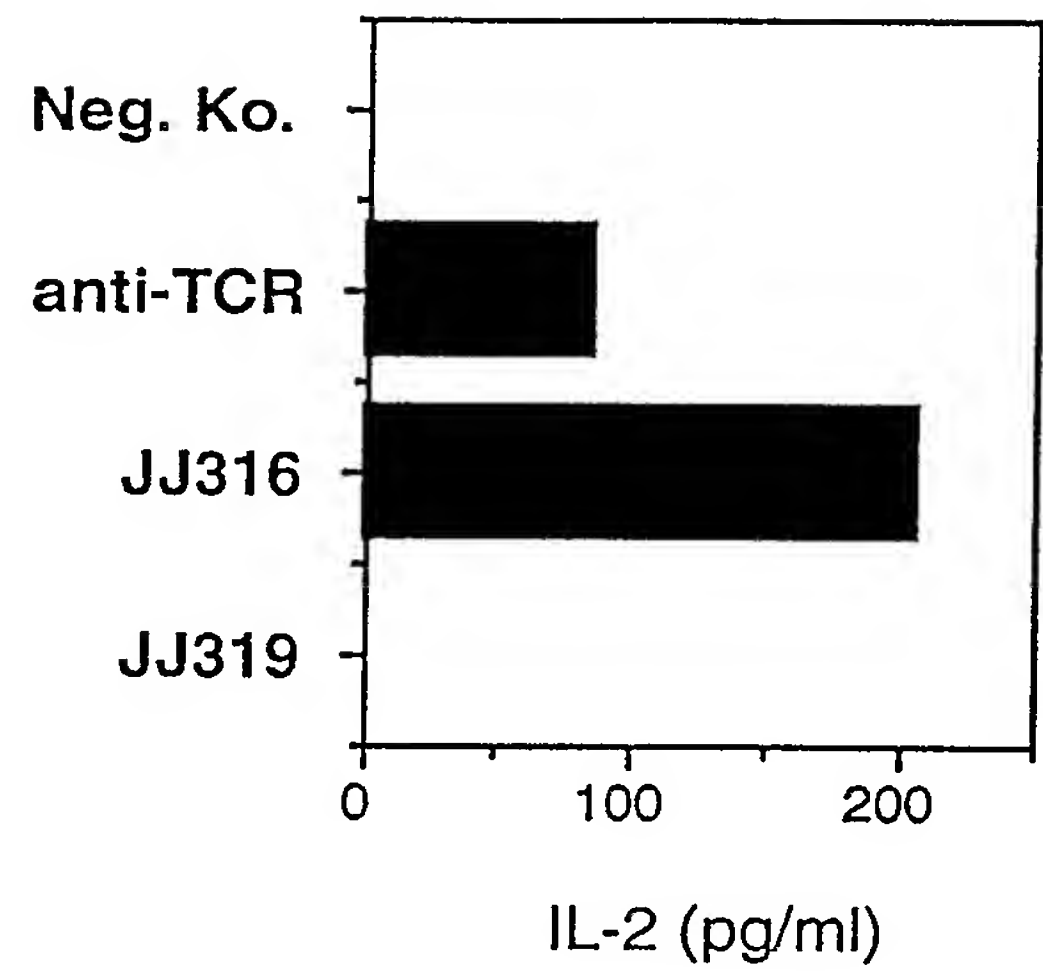
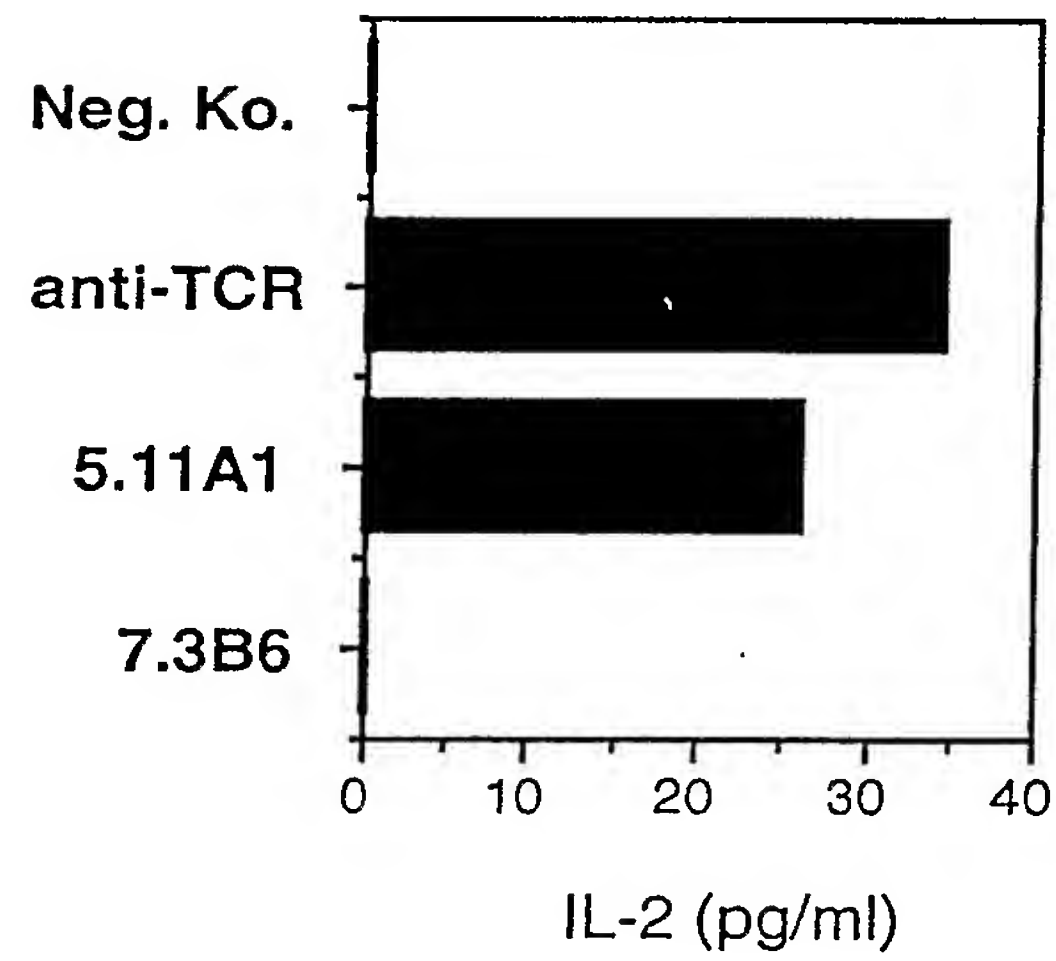


FIG. 6

FIG. 7



a



b

## FIG. 8

1 50  
GATATCCAGA CGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA  
51 100  
CAGAGTCACC ATCAGTTGCA GGGCAGGTCA GGACATTAGT AATTATTTAA  
101 150  
ACTGGTATCA GCAGAAACCA GATGGAAGTCT TTAAGCTCCT GATCTACTAC  
151 200  
ACATCAAGAT TACACTCAGG AGTCCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC  
201 250  
TGGAACAGAT TATTCTCTCA CCATTAGCAA CCTGGAGCAA GAAGATATTG  
251 300  
CCACTTACTT TTGCCAACAG GGTCATACGC TTCCGTGGAC GTTCGGTGGA  
301 321  
GGCACCAAGC TGGAAATCAA A

a

1 50  
DIQTTQTTSS LSASLGDRVT ISCRAGQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY  
51 100  
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GHTLPWTFGG  
101 107  
GTKLEIK

b

## FIG. 8

1 50  
GATGTGCAGC TTCAGGAGTC GGGACCTGGC CTGGTGAAAC CTTCTCAGTC  
51 100  
TCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCACTGGCTA CTCAATCACC AGTGATTATG  
101 150  
CCTGGAACTG GATCCGGCAG TTTCCAGGAA ACAAACCTGGA GTGGATGGGC  
151 200  
TACATAAGAT ACAGTGGTAG TACTAGCTAC AATCCATCTC TCAAAAGTCG  
201 250  
AATCTCTATC ACTCGAGACA CATCCAAGAA CCAGTTCTTC CTGCAGTTGA  
251 300  
ATTCTGTGAC TACTGAGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC AAGAGATTGG  
301 350  
CCGCGACCGA GCTACTGGTA CTTGATGTC TGGGGCGCAG GGACCACGGT  
351 363  
CACCGTCTCC TCA

C

1 50  
DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRO FPGNKLEWMG  
51 100  
YIRYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNQFF LQLNSVTED TATYŸCARDW  
101 121  
PRPSYWYFDV WGAGTTVTVS S

d

## FIG. 8

1 50  
CAGGTCCAAC TGCAGCAGTC CGGACCTGAG CTGGTGAAGC CGGGGACTTC  
51 100  
AGTGAGGATT TCCTGCGAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACA AGCTACTATA  
101 150  
TAACTGGGT GAAACAGAGG CCTGGACAGG GACTTGAGTG GATTGGATGT  
151 200  
ATTTATCCTG GAAATGTCAA TACTAACTAT AATGAGAAGT TCAAGGACAA  
201 250  
GGCCACACTG ATTGTAGACA CATCCTCCAA CACTGCCTAC ATGCAGCTCA  
251 300  
GCAGAATGAC CTCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTAC AAGATCACAC  
301 350  
TACGGCCTCG ACTGGAACCT CGATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC  
351 360  
CGTCTCCTCA

e

1 50  
QVQLQQSGPE LVKPGTSVRI SCEASGYTFT SYYIHWVKQR PGQGLEWIGC  
51 100  
IYPGNVNTNY NEKFKDKATL IVDTSNTAY MQLSRMTSED SAVYFCTRSH  
101 120  
YGLDWNFDVW GAGTTVTVSS

f

## FIG. 8

1 50  
GACATCCAGA TGAACCAGTC TCCATCCAGT CTGTCTGCAT CCCTTGGAGA  
51 100  
CACAAATTACC ATCACTTGCC ATGCCAGTCA AAACATTTAT GTTTGGTTAA  
101 150  
ACTGGTACCA GCAGAAACCA GGAAATATTC CTAAACTCTT GATCTATAAG  
151 200  
GCTTCCAACC TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTTAGTG GCAGTGGATC  
201 250  
TGGAACAGGC TTCACATTAA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG  
251 300  
CCACTTACTA CTGTCAACAG GGTCAAACCT ATCCGTACAC GTTCGGAGGG  
301 321  
GGGACCAAGC TGGAAATAAA A

g

1 50  
DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ITCHASQNIY VWLNWYQQKP GNIPKLLIYK  
51 100  
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQTPYTFEGG  
101 107  
GTKLEIK

h



## FIG. 8

1 15  
D I Q M T Q S P S S L S A S V  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

16 30  
G D R V T I T C H A S Q N I Y  
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr

31 45  
V W L N W Y Q Q K P G K A P K  
Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

46 60  
L L I Y K A S N L H T G V P S  
Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser

61 75  
R F S G S G S G T D F T L T I  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

76 90  
S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

91 105  
G Q T Y P Y T F G G G T K V E  
Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

106 107  
I K  
Ile Lys

## FIG. 8

1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	15
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	
16	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	30
	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
31	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	45
	Ser	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
46	E	W	I	G	C	I	W	P	G	N	V	N	T	N	Y	60
	Glu	Trp	Ile	Gly	Cys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Tyr	
61	N	E	K	F	K	D	R	A	T	L	T	V	D	T	S	75
	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	
76	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	90
	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	
91	T	A	V	Y	F	C	T	R	S	H	Y	G	L	D	W	105
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Gly	Leu	Asp	Trp	
106	N	F	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	120
	Asn	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	

j

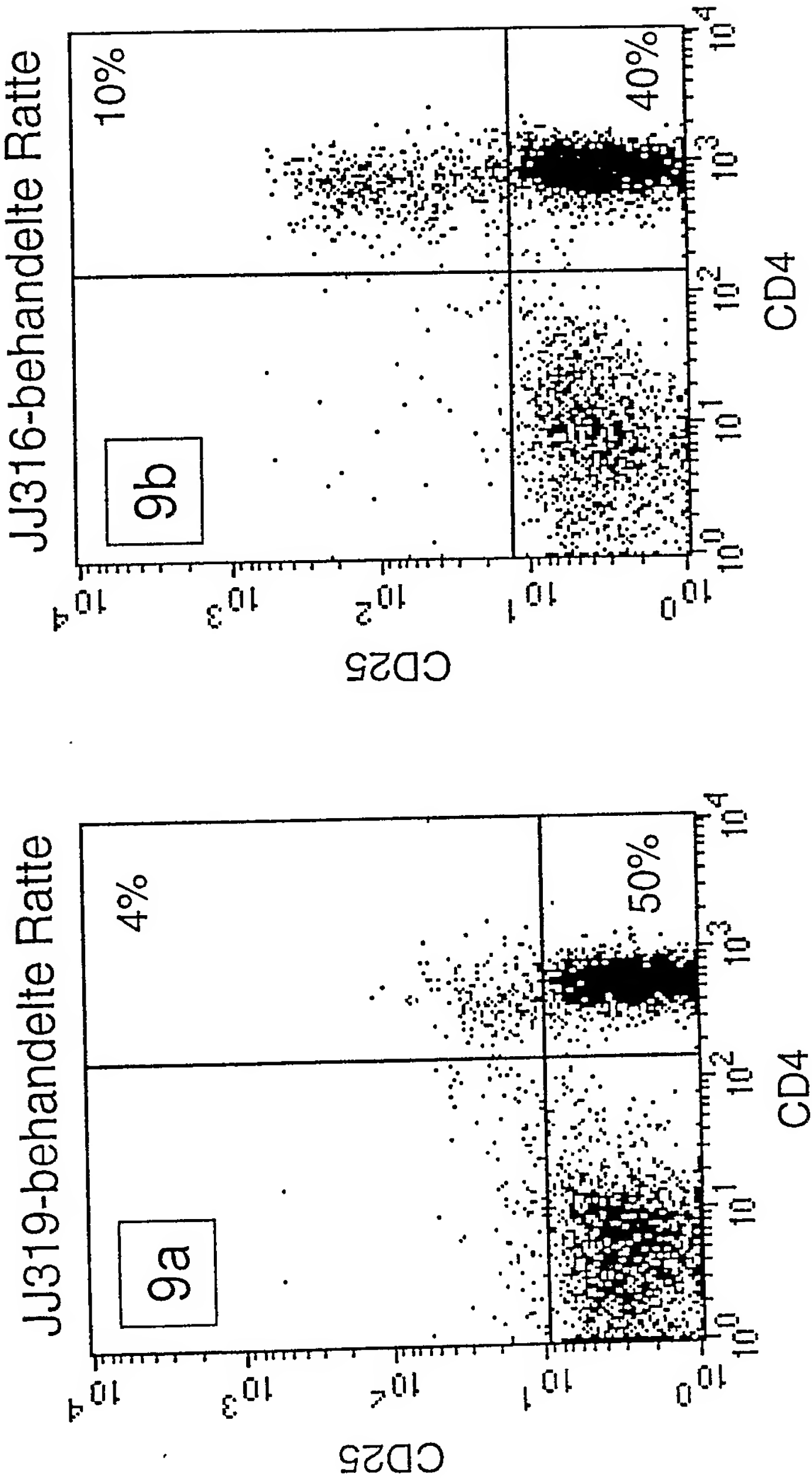


FIG. 9

JJ316-behandeltes Tier

unbehandeltes Tier

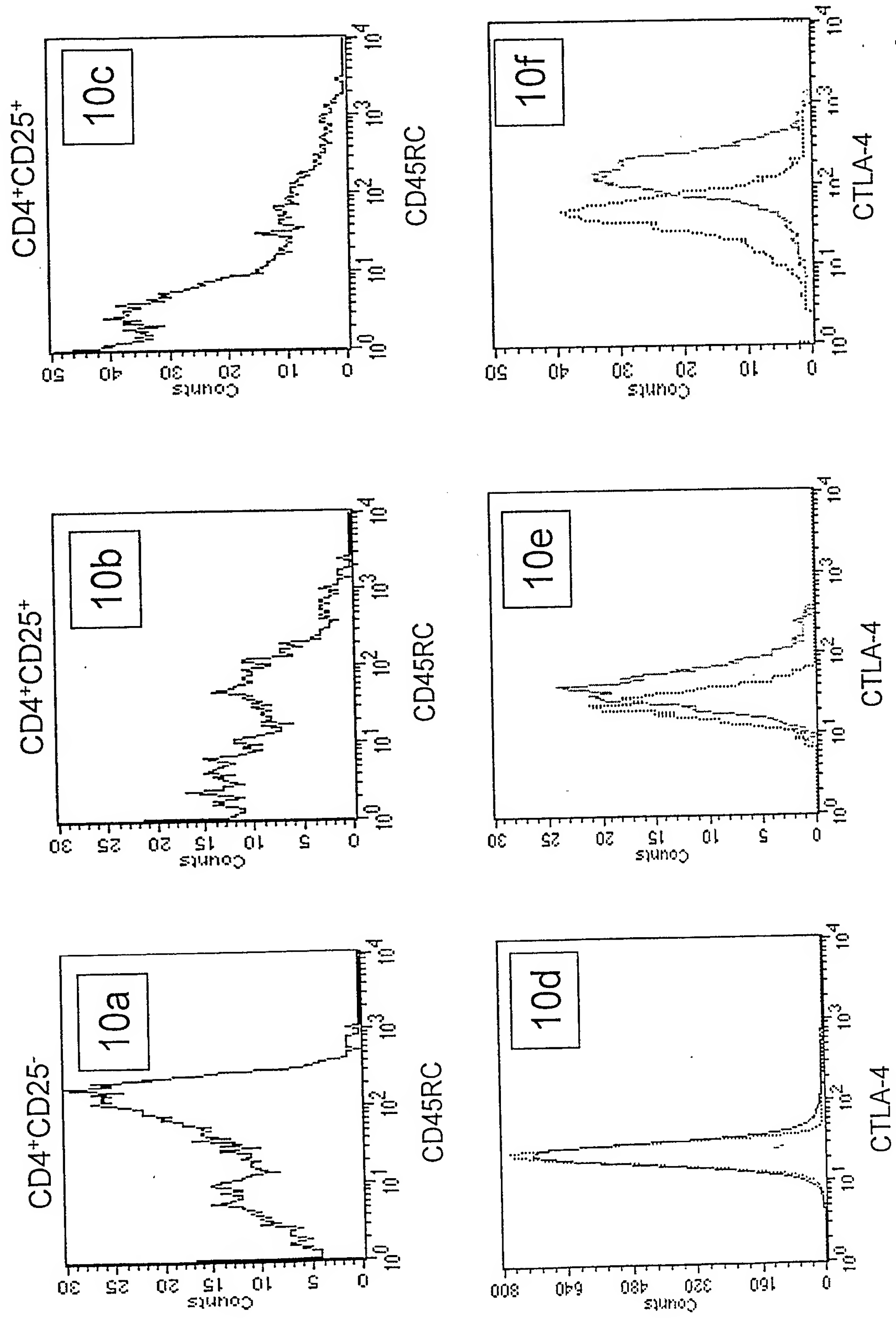


FIG. 10

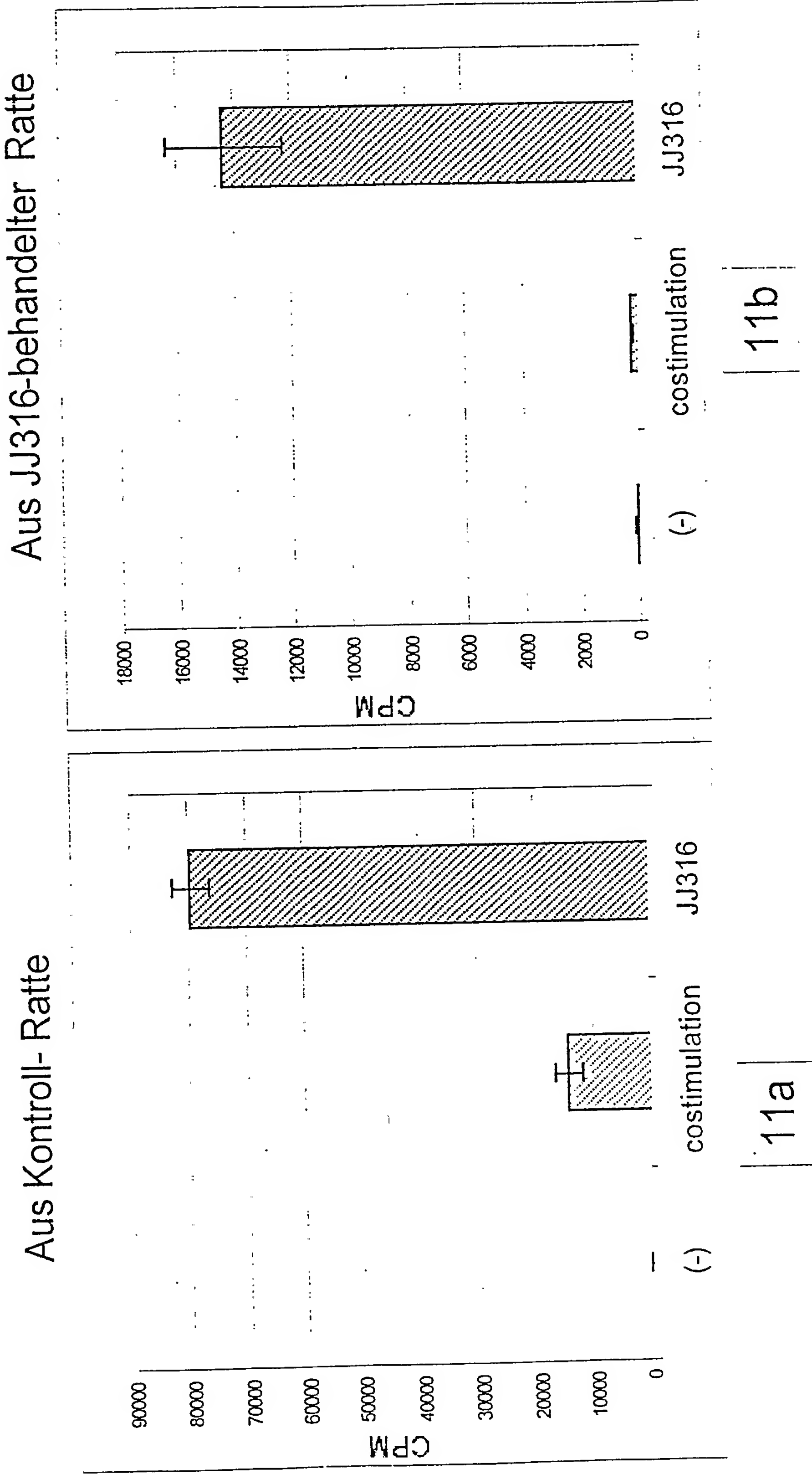


FIG. 11

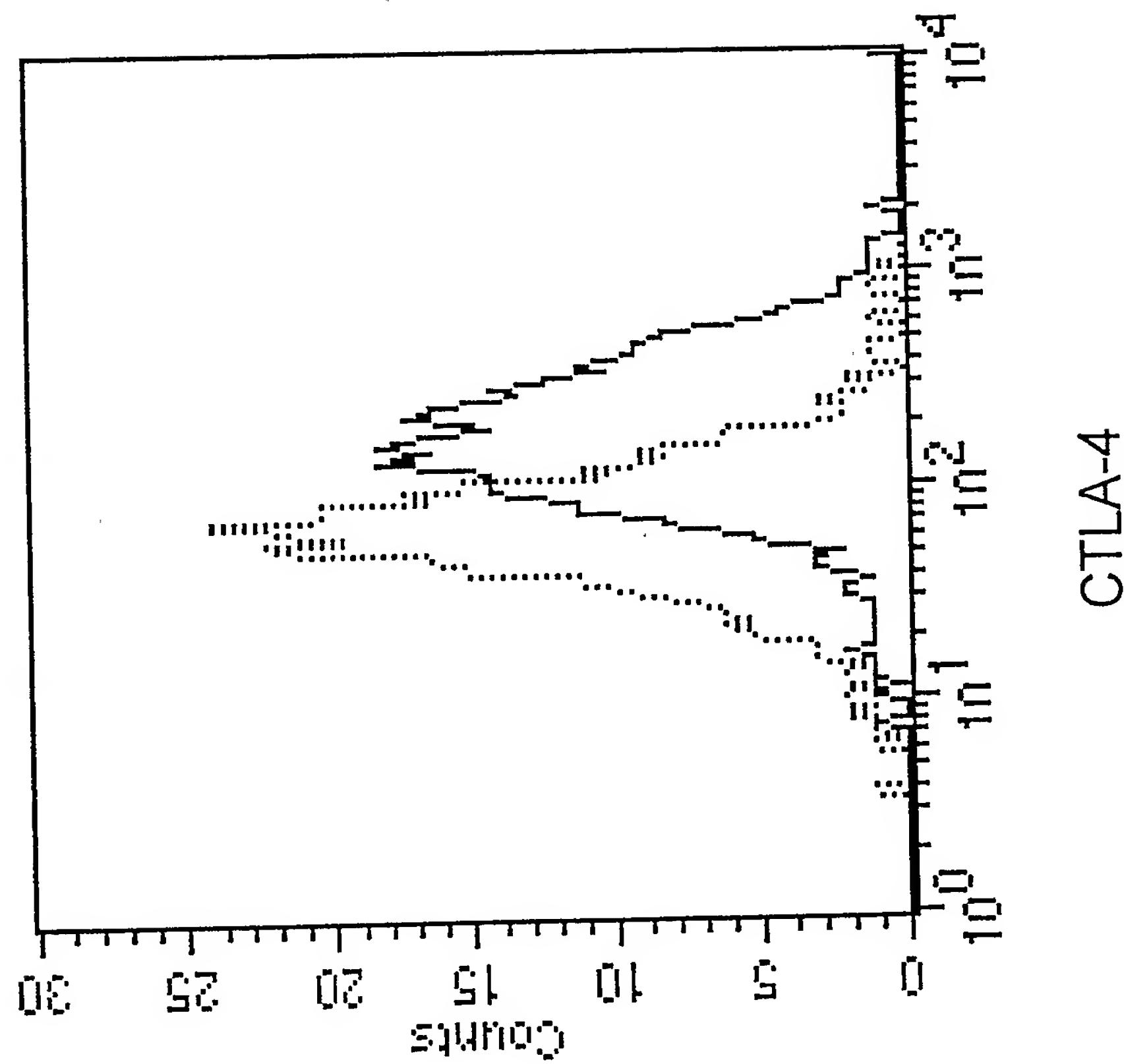


FIG. 12



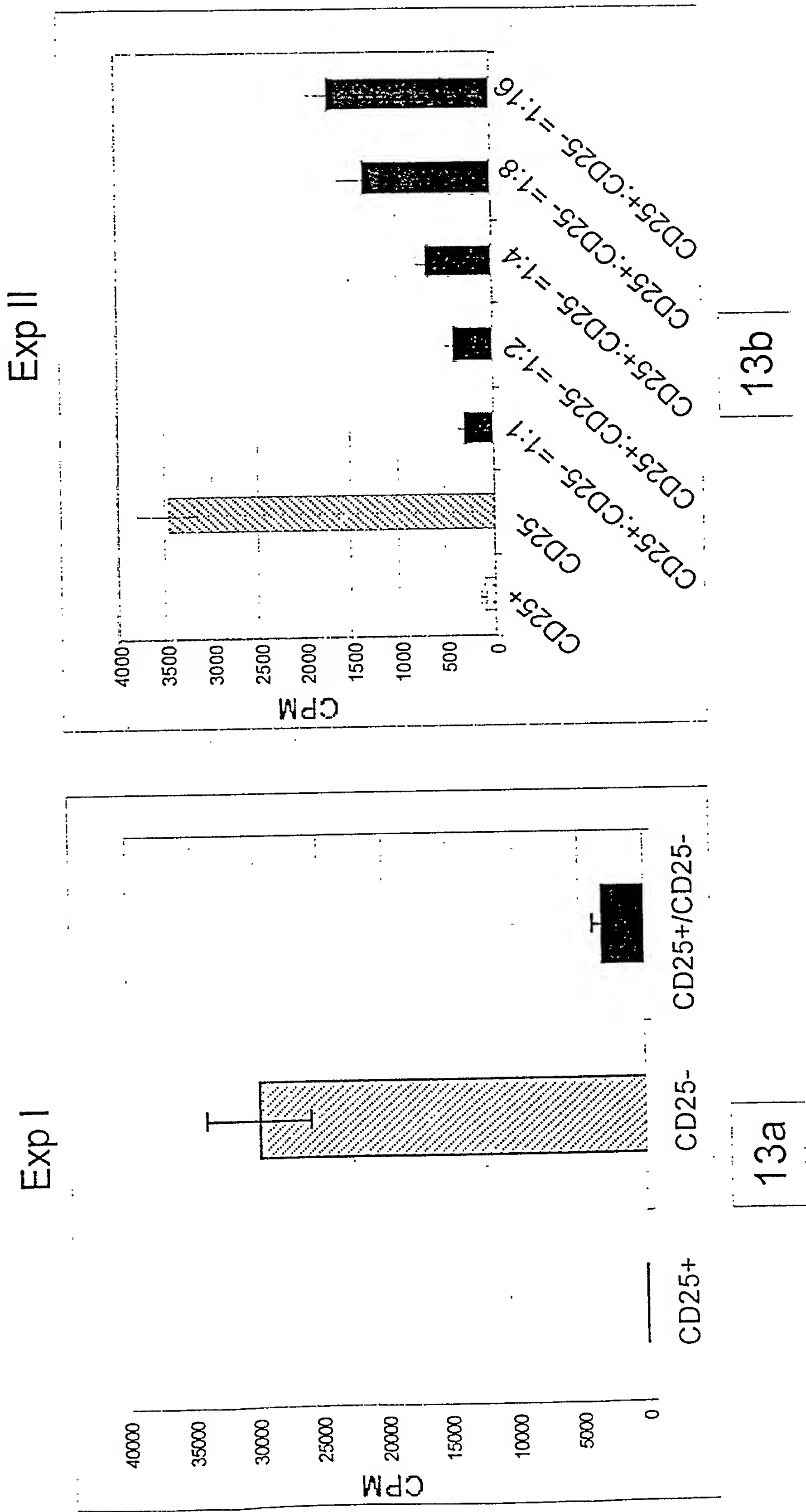
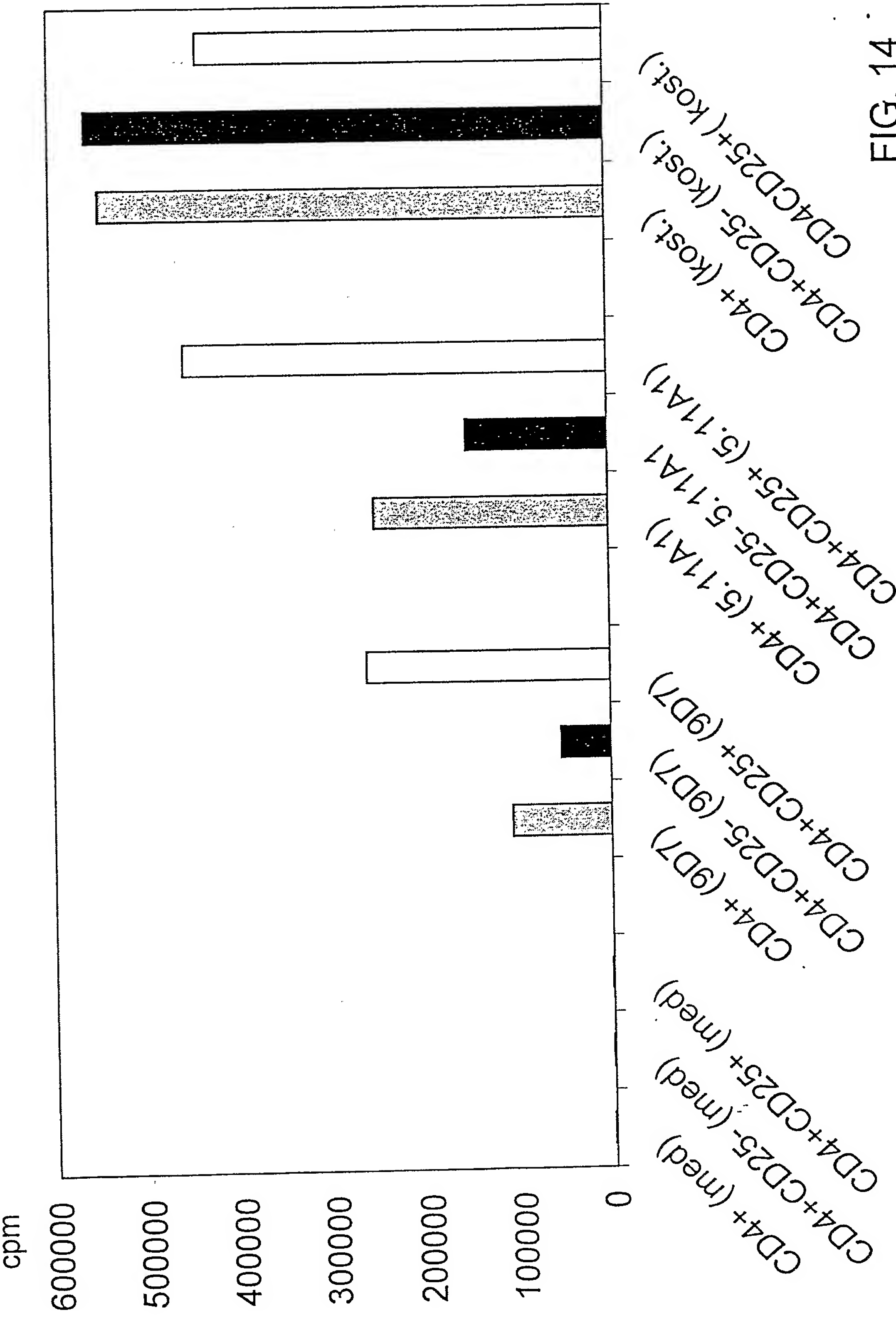
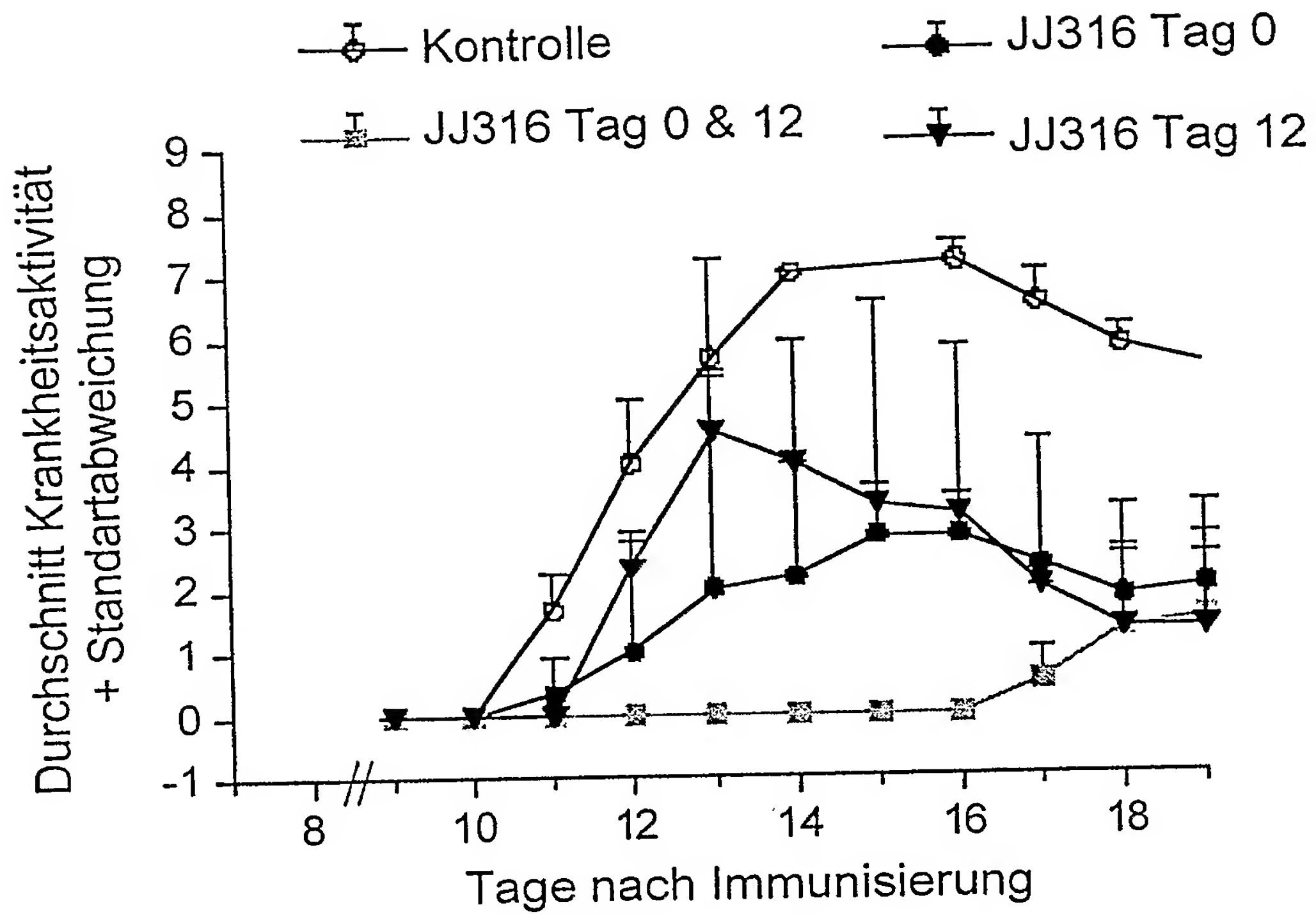


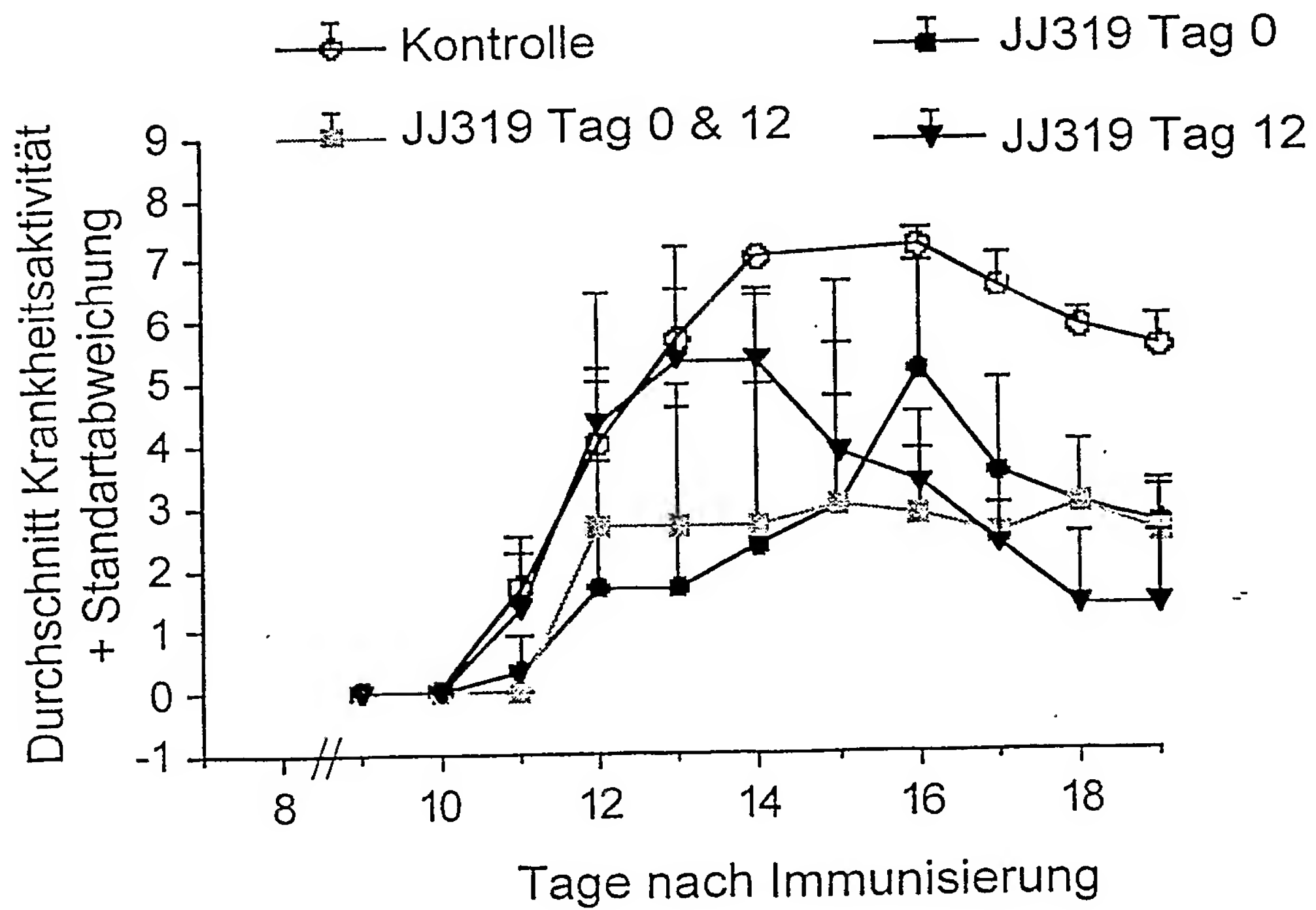
FIG. 13

FIG. 14





a



b

FIG. 16

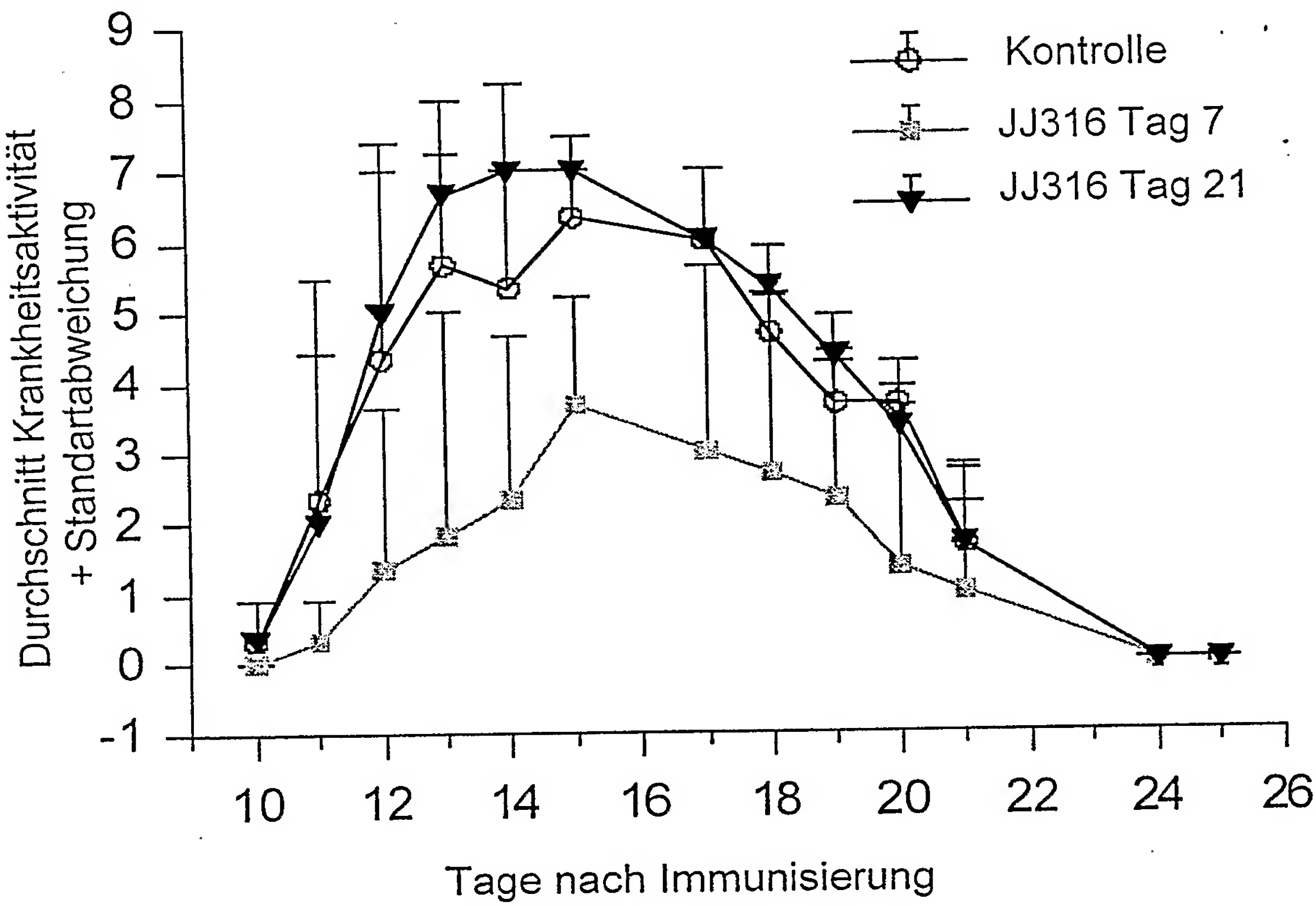
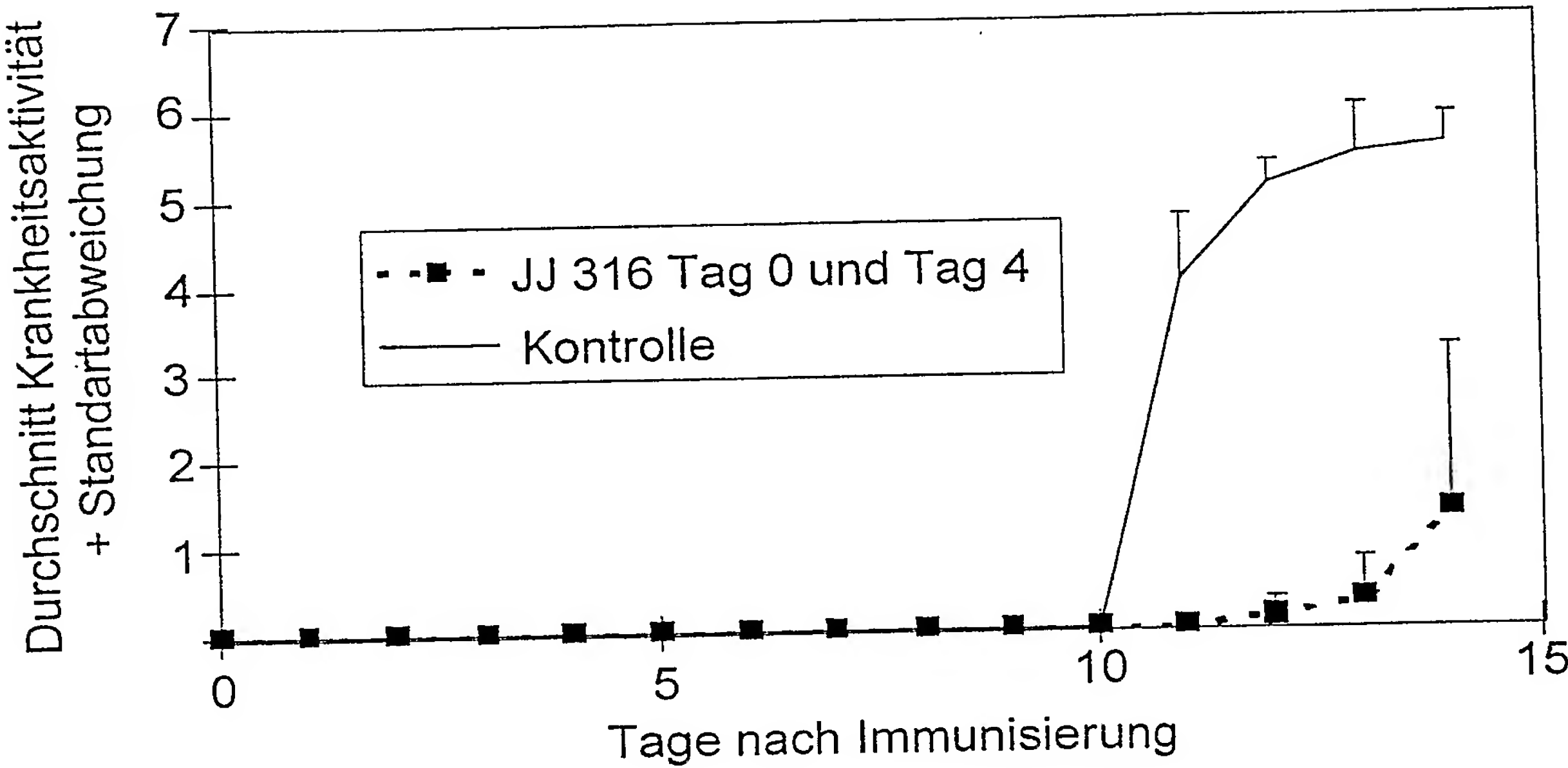


FIG. 17



a

FIG. 17

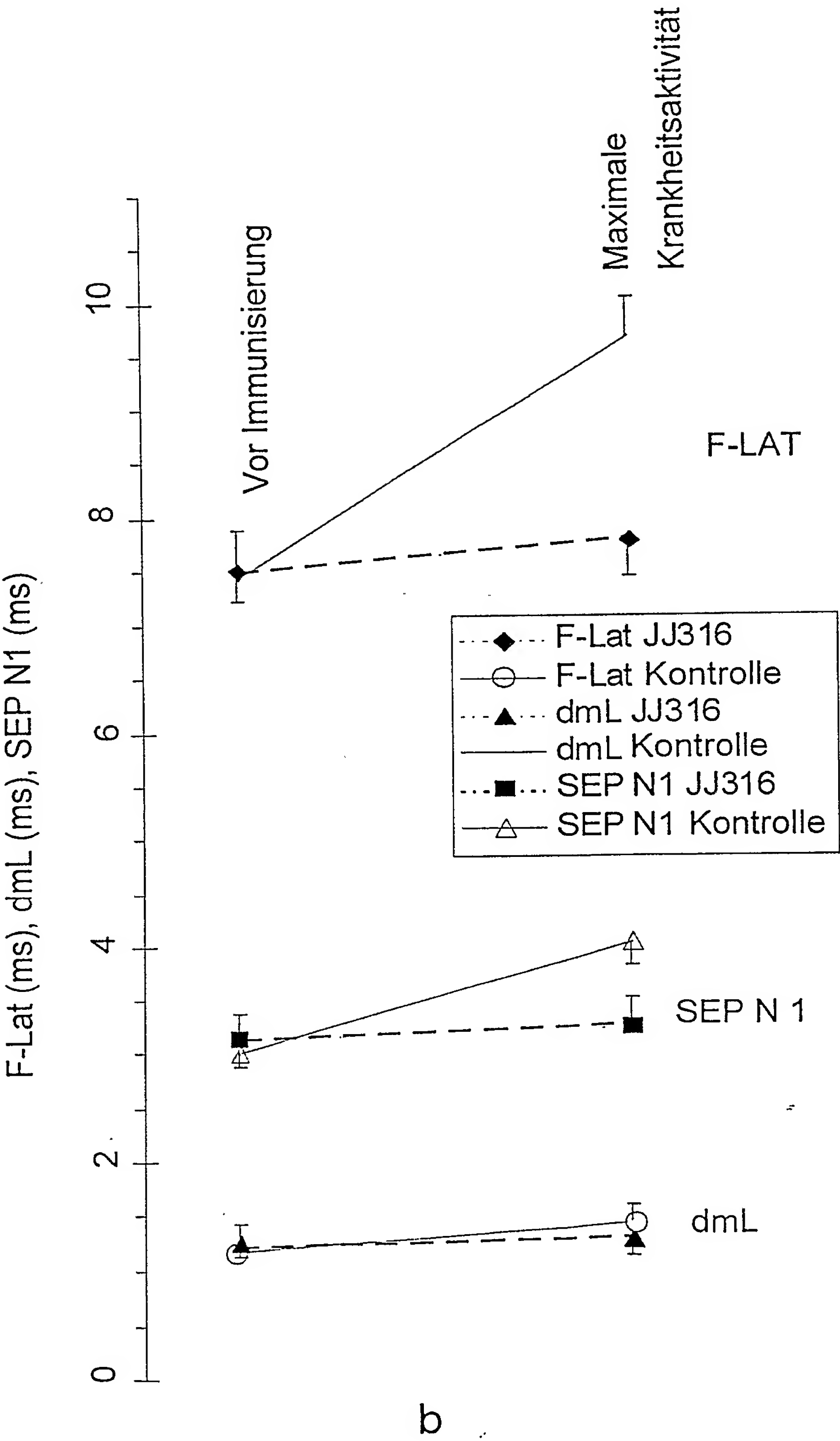
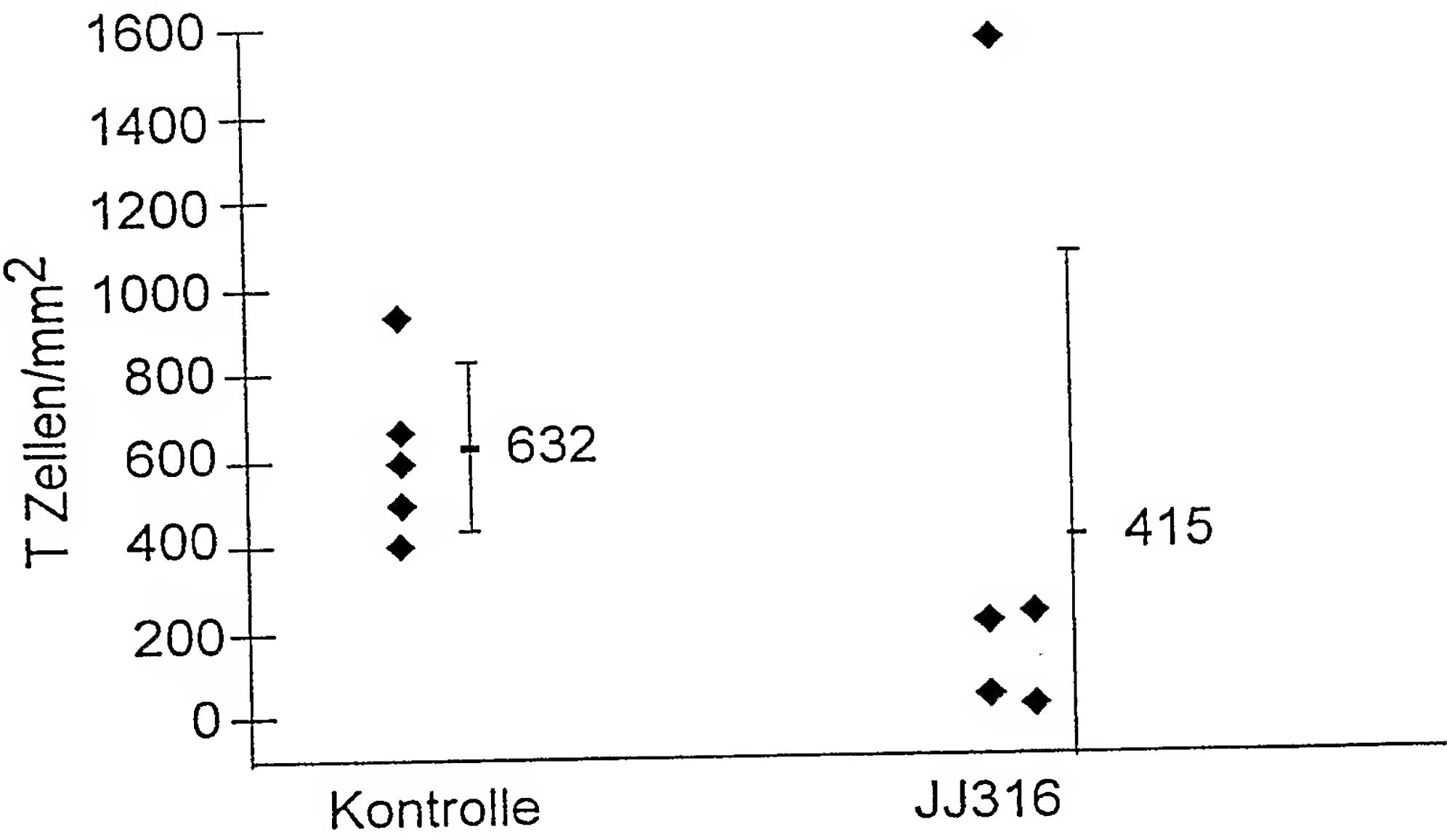




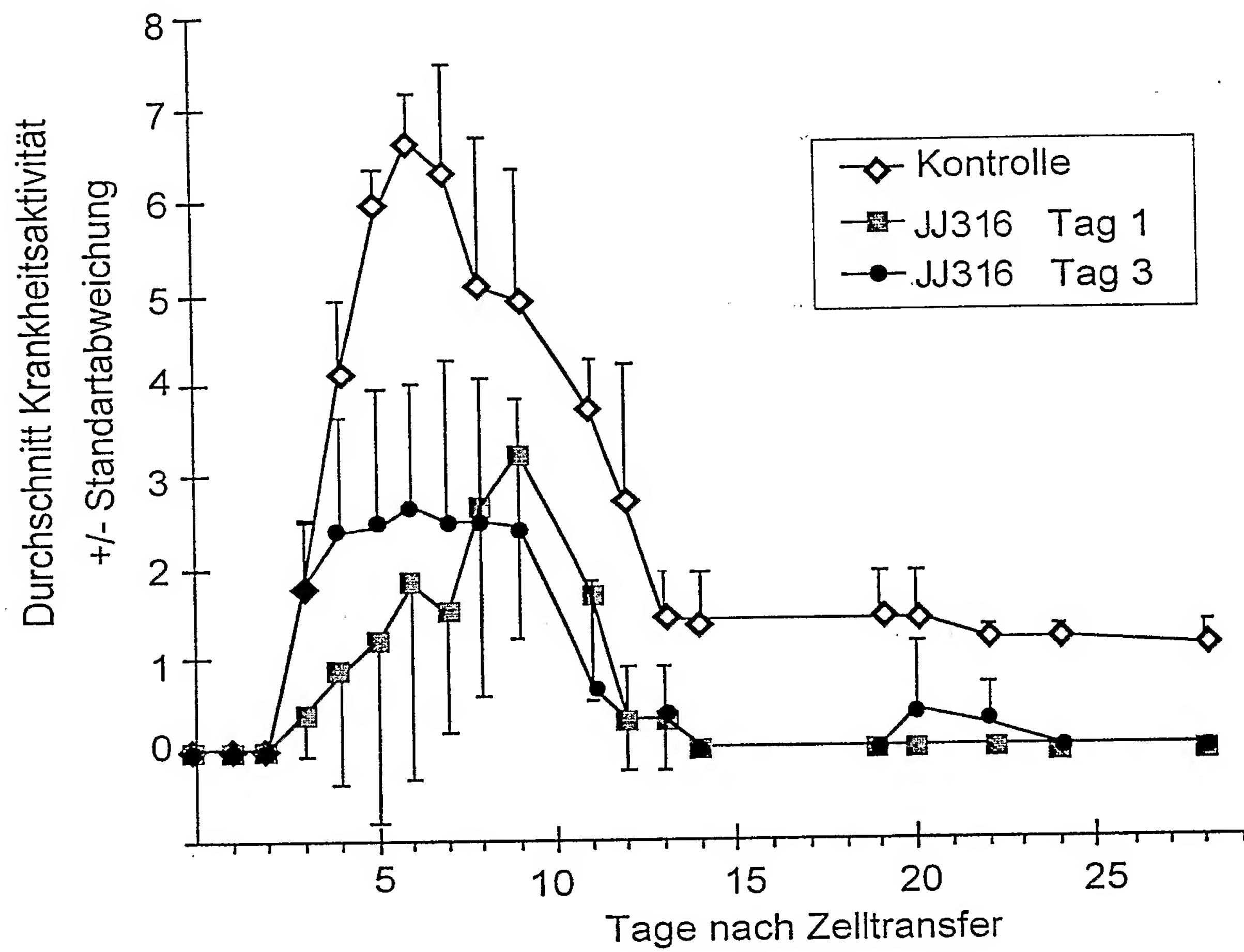
FIG. 17



C

FIG. 18

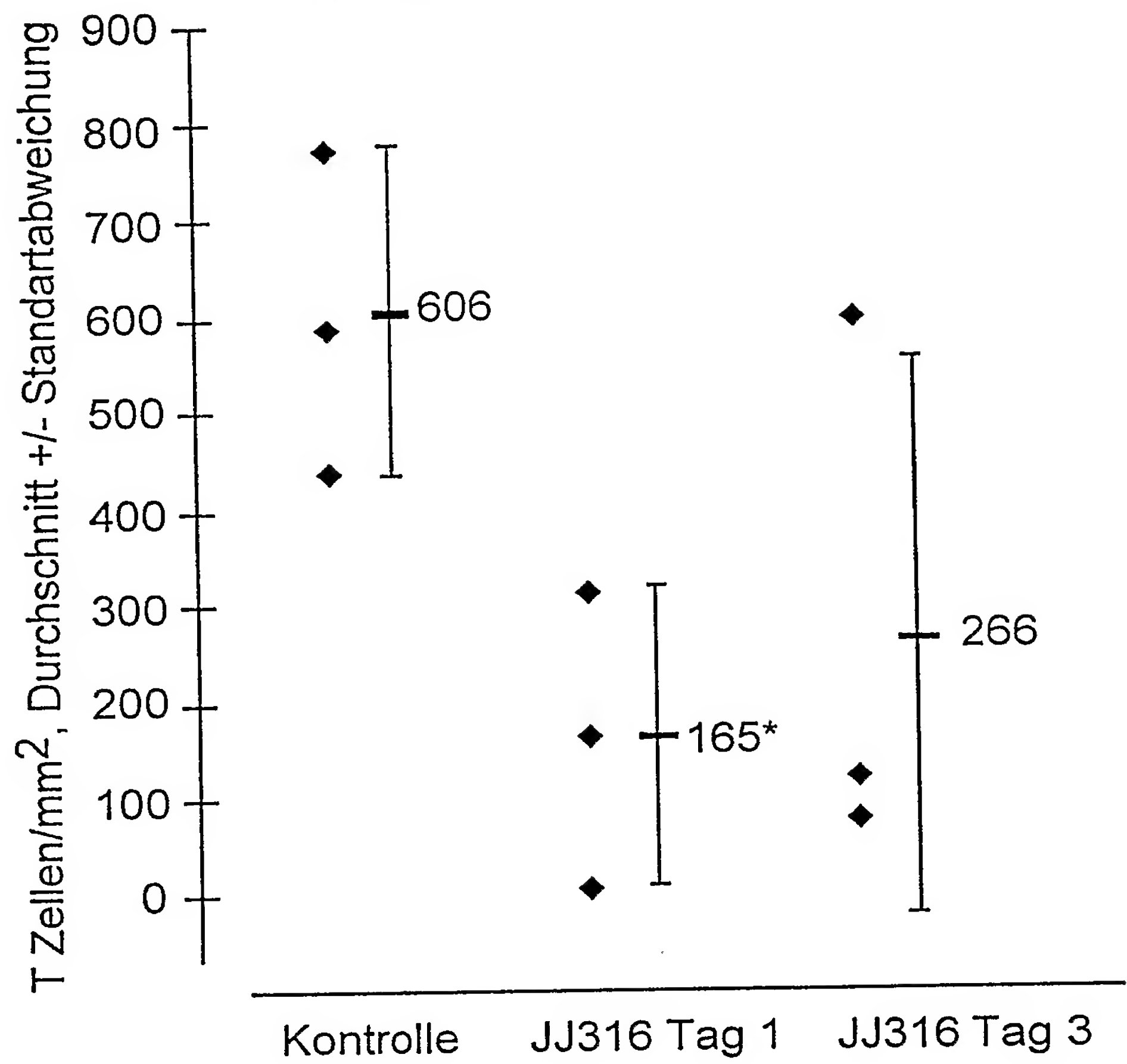
25/31



Tag 0 bis Tag 6: n=6  
von: Tag 7: n=3

a

FIG. 18<sup>26/31</sup>



\*p < 0.05 JJ316 Tag 1 gegenüber Kontrolle

b

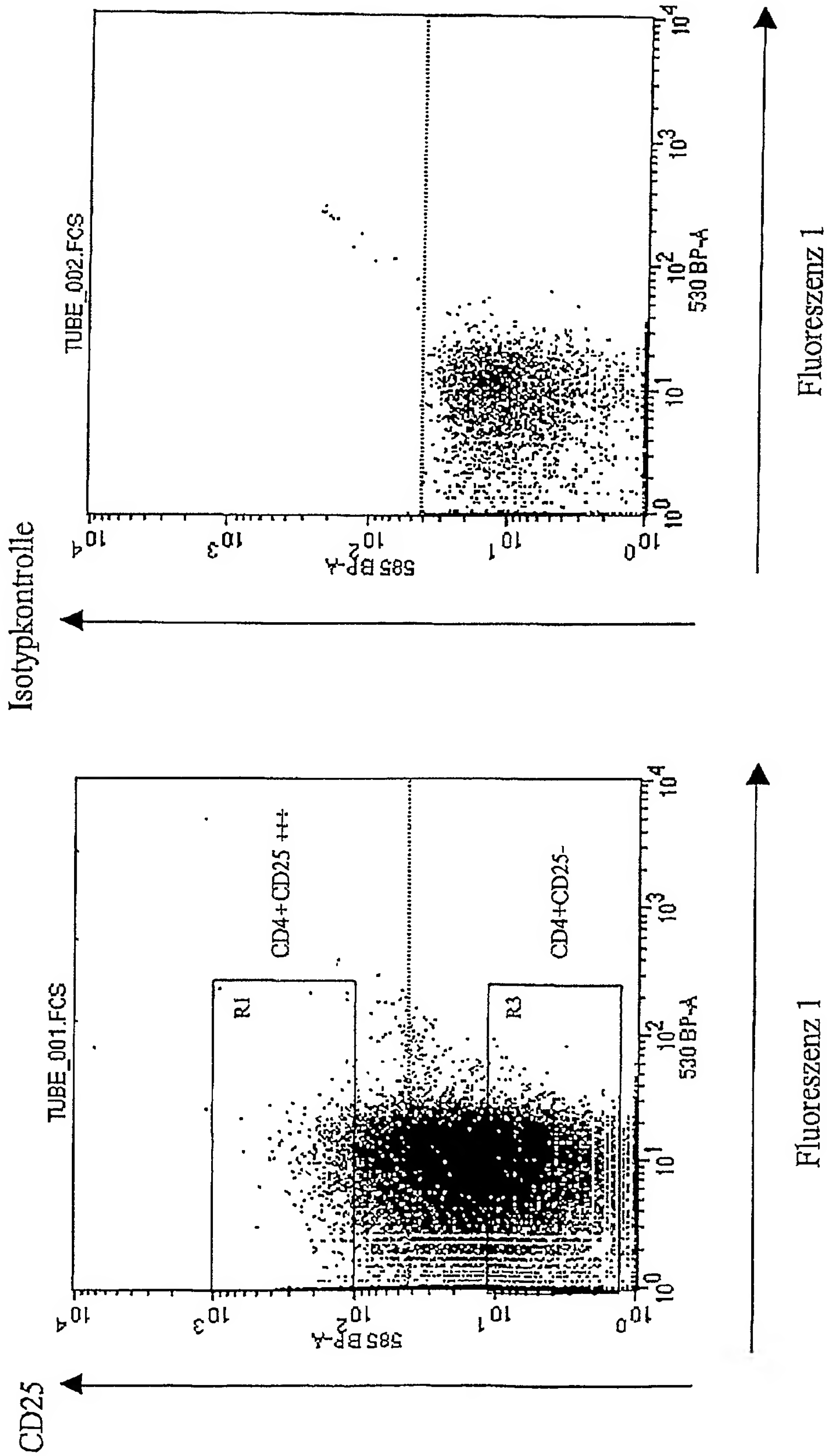


Abb.19

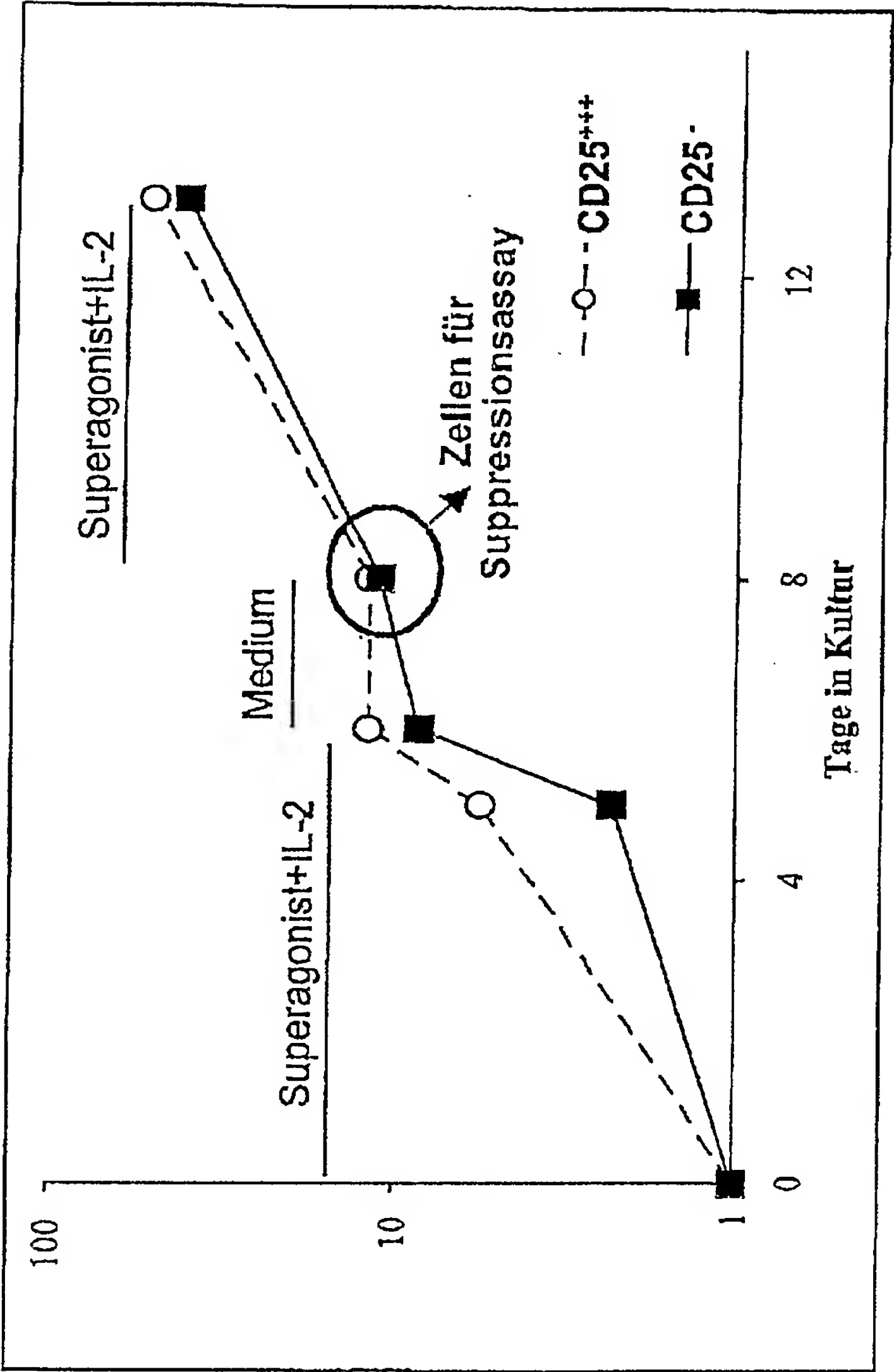


Abb. 20

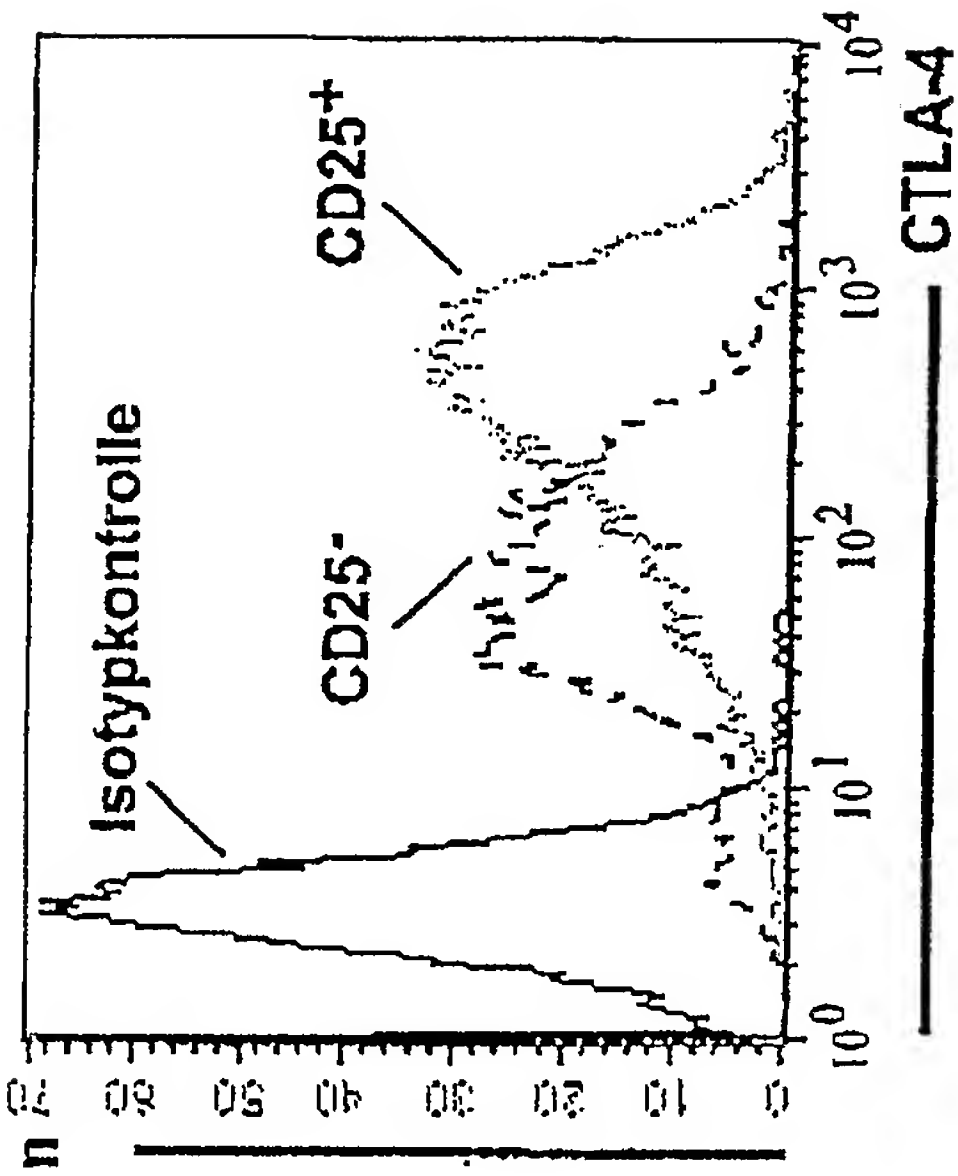
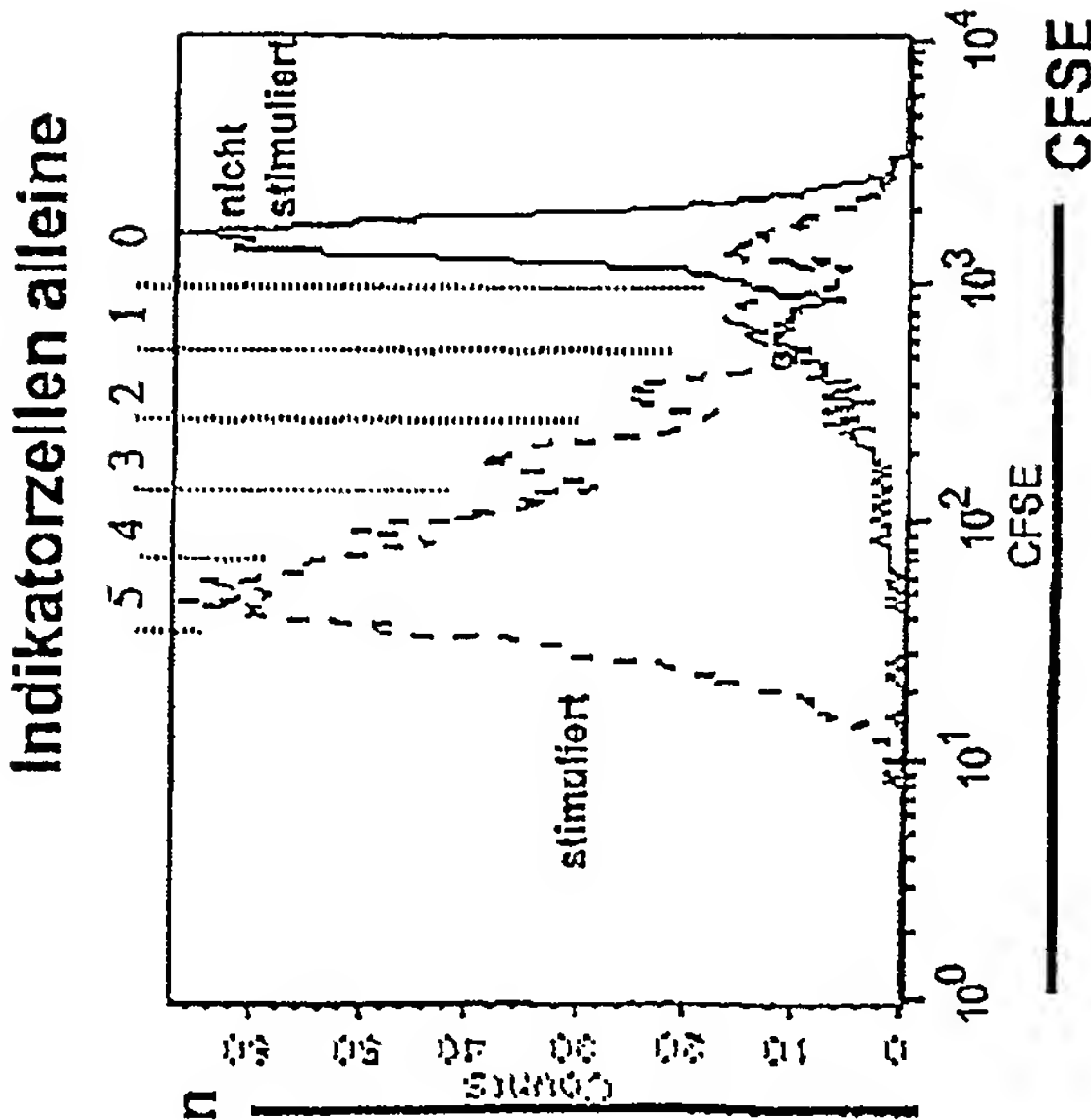


Abb. 21

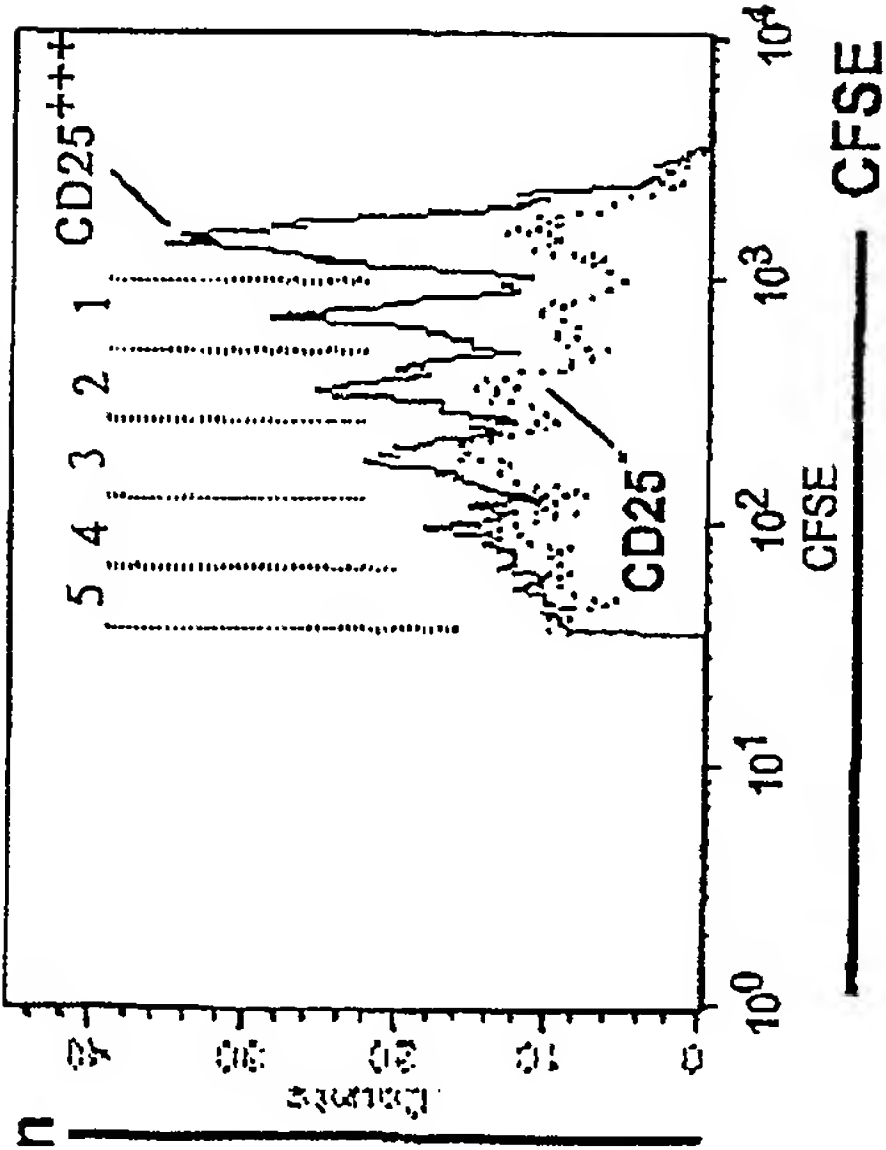


Teilungen	Stimuliert	Nicht stimuliert
0	5,90%	70,60%
1	6,00%	13,30%
2	9,00%	9%
3	16,00%	4,60%
4	21,90%	2,10%
5	29,10%	0,70%

Abb. 22a



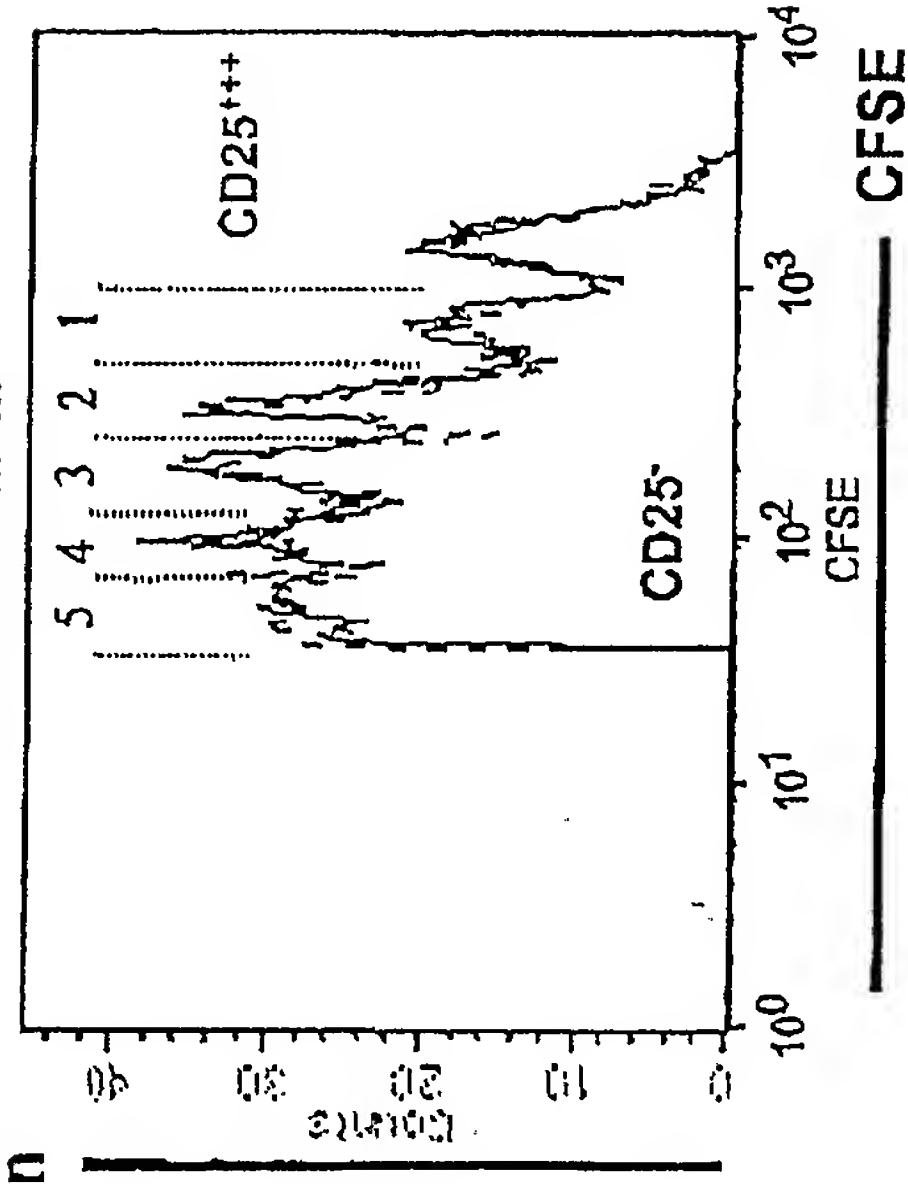
1:1 Kokultur



Teilungen	CD25+++	CD25-
0	28,90%	18,60%
1	17,20%	14,00%
2	17,70%	19,20%
3	17,40%	23,10%
4	13,30%	17,40%
5	6,30%	9,00%

Kolmogorov-Smirnov-Statistik mit Programm  
Cell Quest:  $p < 0,001$   
Mann-Whitney-U-Test (einseitig):  
 $p < 0,00115741$

1:5 Kokultur



Teilungen	CD25+++	CD25-
0	13,80%	14,30%
1	12,00%	12,10%
2	17,60%	16,60%
3	23,10%	22,60%
4	21,80%	22,30%
5	12,80%	13,30%

Kolmogorov-Smirnov-Statistik mit Programm  
Cell Quest:  $p > 0,1$   
Mann-Whitney-U-Test (einseitig):  
 $p = 0,330986$

## SEQUENCE LISTING

<110> TeGenero GmbH

<120> Verwendung einer an CD28 bindenden Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung

<130> UNW/DE/0101

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Val Tyr Ser Lys Thr Gly  
1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 2

Tyr Ser Lys Thr  
1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 3

Tyr Ser Lys Thr Gly  
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 4

Val Tyr Ser Lys Thr  
1 5

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 5

Tyr Ser Lys Thr Gly Phe  
1 5

<210> 6  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 6

Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 7

Ser Lys Thr Gly Phe  
1 5

<210> 8  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 8

Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln  
1 5

<210> 9  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 9

gatatccaga cgacacagac tacatcctcc cgttctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcagggtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaagctcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtcatagcg ttccgtggac gttcgggtgga 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<400> 10

Asp Ile Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gly Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<400> 11

gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60  
 acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagat acagtggtag tactagctac 180  
aatccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240  
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagattgg 300  
ccgcgaccga gctactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360  
tca 363

<210> 12  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 12

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Trp Pro Arg Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 13  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 13  
 caggtccaac tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc cggggacttc agtgaggatt 60  
 tcctgcgagg cttctggcta caccttcaca agctactata tacactgggt gaaacagagg 120  
 cctggacagg gacttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180  
 aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg attgtagaca catcctccaa cactgcctac 240  
 atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtac aagatcacac 300  
 tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 14  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 15  
 <211> 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 15

```

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtc aaacatttat gtttgggttaa actggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaactctt gatctataag gcttccaacc tgcacacagg cgtcccatca      180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggc ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa a                                              321

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 16

```

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1              5              10              15

```

```

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
                20              25              30

```

```

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
          35              40              45

```

```

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50              55              60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

```

```

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
          85              90              95

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100              105

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial

<400> 17

Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr



	20		25		30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	35		40		45
Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50		55		60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	65		70		75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	85		90		95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln	100		105		110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115		120		